

**ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE**

**VOLUME 14
1965**



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle - PARIS-7^e

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 14
1982



INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
16, rue de Stenard - PARIS 16

**ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE**

VOLUME 14

1965

NUMÉRO 1

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

149, rue de Grenelle - PARIS-7^e

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

NUMERO 1

1982

VOLUME 11

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des
auteurs et de l'Institut national de la Recherche agronomique,
à l'exception des sommaires et résumés.

ÉVOLUTION DE L'INDICE DES SUBSTANCES AROMATIQUES VOLATILES DES RAISINS DE DEUX CÉPAGES ROUGES AUX COURS DE LEUR MATURATION

L. DEIBNER, J. MOURGUES et Mireille CABIBEL-HUGUES

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

L'évaluation des substances aromatiques volatiles du raisin au cours de sa maturation n'est pas encore entrée dans la pratique. Dans ces conditions, il est apparu utile d'effectuer sur ce point des études plus systématiques concernant le dosage global et conventionnel de ces substances, à l'aide d'une méthode, utilisant l'oxydation chromique, proposée par NILOV en 1953.

Les résultats obtenus pour deux cépages rouges, *Carignan* et *Seyve-Villard 18315*, ont été comparés à ceux déjà connus pour d'autres cépages.

I. — INTRODUCTION

L'appréciation exacte des qualités du raisin en tant que matière première constitue un problème important auquel on n'a pas pu encore trouver une solution convenable. Ce fait s'explique par le manque de méthodes analytiques concernant les composés autres que le sucre et l'acidité. Parmi ces substances les huiles essentielles du raisin occupent une place importante. Même si nos connaissances actuelles sur le rôle et les proportions nécessaires des composés responsables de la saveur et du bouquet des vins apparaissent comme fragmentaires, il est bien certain que les substances volatiles du raisin déterminent non seulement l'arôme spécifique propre à chaque variété, mais également contribuent à la formation du bouquet du vin. Il serait donc utile de différencier les cépages par leur capacité d'accumuler les huiles essentielles ce qui faciliterait également les recherches de sélection. Dans ces conditions, l'évaluation des substances aromatiques dans le raisin doit être effec-

tuée, parallèlement aux dosages du sucre et de l'acidité, lors des études relatives à l'influence de différentes opérations agrotechniques (tailles, fertilisation, irrigation, etc.) et à la détermination des dates de la vendange propices à la conservation plus ou moins grande de ces substances, en fonction de la destination du raisin. C'est pour cette raison que l'étude de l'évolution des substances aromatiques volatiles dans les raisins au cours de leur maturation présente un grand intérêt scientifique et pratique. Malgré l'importance de telles recherches, le manque de procédé de dosage des substances volatiles les rendait impossibles. En utilisant la méthode organoleptique comparative et les extraits alcooliques des pellicules de raisin, GARRARD et LINDET (1896, 1898) ont constaté que l'arôme apparaît à la véraison et s'accroît jusqu'à la maturité. C'est seulement en 1953 que NILOV a proposé un procédé simple pour le dosage global et conventionnel des substances aromatiques dans le raisin, les marcs et les moûts. Grâce à ce procédé NILOV et MALTABAR (1957) (cf. MALTABAR 1959) ont pu étudier la dynamique d'accumulation des substances aromatiques de trois cépages, le *Sylvaner*, le *Serexia*, le *Seibel* n° 1 parallèlement à celles du sucre, de l'acidité et du volume des baies. L'indice des substances volatiles varie au cours de la maturation, son maximum étant atteint soit à la maturité soit avant la maturité ; ensuite il diminue. En 1953 et 1955, DATOUNASCHVILI (1958 a, b) a étudié la dynamique de la modification des teneurs des substances aromatiques des cépages suivants : le *Muscat blanc*, *Aligoté*, *Riesling*, *Chardonnay*, *Traminer rose*, *Pinot noir*, *Cabernet-Sauvignon*. Les résultats obtenus montrent que

1° la concentration maximale des huiles essentielles se trouve dans les pellicules, le mout étant moins riche ;

2° le maximum d'accumulation des substances aromatiques apparaît à des époques différentes pour les différentes variétés de raisin, pour des teneurs variables en sucre avant ou au moment de la maturité physiologique ;

3° la surmaturation du raisin détermine la diminution de la quantité de ces substances.

OUNGOURIAN (1960) a effectué la même étude pendant la maturation du raisin d'*Aligoté*. Tout récemment, IVANOV (1962) a suivi les variations des teneurs en composés aromatiques de deux variétés de raisins bulgares, le *Muscat rouge* et le *Proslava*, et a constaté qu'au cours de la maturation de ces derniers, les courbes des substances volatiles, évaluées suivant le procédé de NILOV (1953), suivent celles de l'acidité de titrage ; en outre, il a confirmé que les pellicules des raisins sont de deux, trois, ou quatre fois plus riches en composés aromatiques que les moûts correspondants. Pour DATOUNASCHVILI (1961), il est indispensable de prévoir deux dates de vendanges, suivant la destination du raisin ; une correspondante à une teneur maximale en substances volatiles et l'autre à la quantité maximale de sucre. Le même auteur a commencé les études concernant l'extraction et l'étude des huiles essentielles contenues dans les rameaux verts et dans les feuilles de la vigne. Signalons pour terminer les travaux d'AROUTUNIAN et DJANPOLADIAN (1959, 1960) et de SAMVELIAN (1961) concernant l'influence favorable des engrais potassiques et phosphatés sur les teneurs en substances aromatiques. Il est intéressant de noter que les engrais potassiques sont plus efficaces dans le cas des cépages rouges, tandis que le raisin blanc est plus sensible aux fertilisants phosphatés. D'ailleurs, la fertilisation par pulvérisation permet également d'obtenir des résultats positifs.

A notre connaissance, il n'existe pas en Europe Occidentale de travaux consacrés à l'étude de la dynamique des substances aromatiques volatiles des raisins pendant leur maturation. Dans ces conditions, nous avons cru utile d'effectuer au cours de l'été 1963 des recherches semblables sur les fruits de deux cépages méridionaux utilisés tels quels avec la pruine sans chercher à dissocier le rôle éventuel de cette dernière dans le complexe des substances aromatiques du raisin.

II. — MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

A l'aide de prélèvements dans deux parcelles, l'une de *Vitis vinifera* (cépage *Carignan rouge*), l'autre d'hybride rouge (*Seyve-Villard 18315*), nous avons suivi en 1963, deux fois par semaine, les variations de l'indice des substances aromatiques volatiles et d'un certain nombre d'éléments caractéristiques de la composition du jus.

1^o PRÉLÈVEMENTS

Dans deux vignes, l'une de *Carignan rouge* du Domaine expérimental de Pech-Rouge (Aude), l'autre de *Seyve-Villard 18315* (hybride rouge) de Fleury d'Aude (1), on a délimité des parcelles de 150 souches. Deux fois par semaine un prélèvement de 300 baies est fait à raison de deux grains par souche choisis au hasard selon BENVENIN et CAPT (1955) et HUGLIN et JULLIARD (1955, 1959).

Ces deux baies sont prélevées sur le côté droit et gauche de la première souche, puis à l'avant et à l'arrière de la deuxième souche et ainsi de suite, en alternant les grappes. Sur ces 300 grains on prélève au hasard deux prises d'essai de 20 g, destinées à l'évaluation de l'indice des substances volatiles, et une troisième prise de 100 baies, toutes sans pédicelles, coupées au niveau du bourrelet avec des ciseaux.

2^o MÉTHODES ANALYTIQUES

a) Analyses courantes

Tout d'abord on effectue sur la prise de 100 baies les analyses suivantes : le poids de ces baies et le pourcentage de grains colorés. Ensuite les baies sont écrasées complètement dans un bécier en matière plastique à l'aide d'un disque en acier inoxydable muni d'une tige en même métal. Le jus obtenu est filtré à travers une toile en nylon. Ensuite on effectue les dosages suivants :

— l'acidité de titrage — 5 ml de jus, additionnés de 2 gouttes d'une solution de phénolphtaléine à 1 p. 100 dans l'alcool à 96°GL, sont titrés avec la solution décimale d'hydroxyde de sodium, les résultats étant exprimés en grammes d'acide sulfurique par litre ;

— la teneur en sucres, en grammes par litre, est mesurée à l'aide d'un réfractomètre à main O.P.L. (en grammes de saccharose pour 100 g de solution) et de tables permettant la conversion des lectures réfractométriques en sucres probables (JAULMES, 1951).

— la concentration en ions-hydrogène, exprimée en pH, déterminée à l'aide d'un potentiomètre Radiometer.

b) Indices des substances aromatiques volatiles

Nous avons fait appel au procédé de NILOV (1953) en raison de la commodité du mode opératoire, déjà utilisé par l'un de nous (DEIBNER, RIFAÏ, 1958) au cours de l'étude sur la conservation des jus de raisin.

(1) Nous remercions M. GIBERT, viticulteur à Fleury d'Aude, pour son aimable autorisation d'effectuer des prélèvements dans son vignoble.

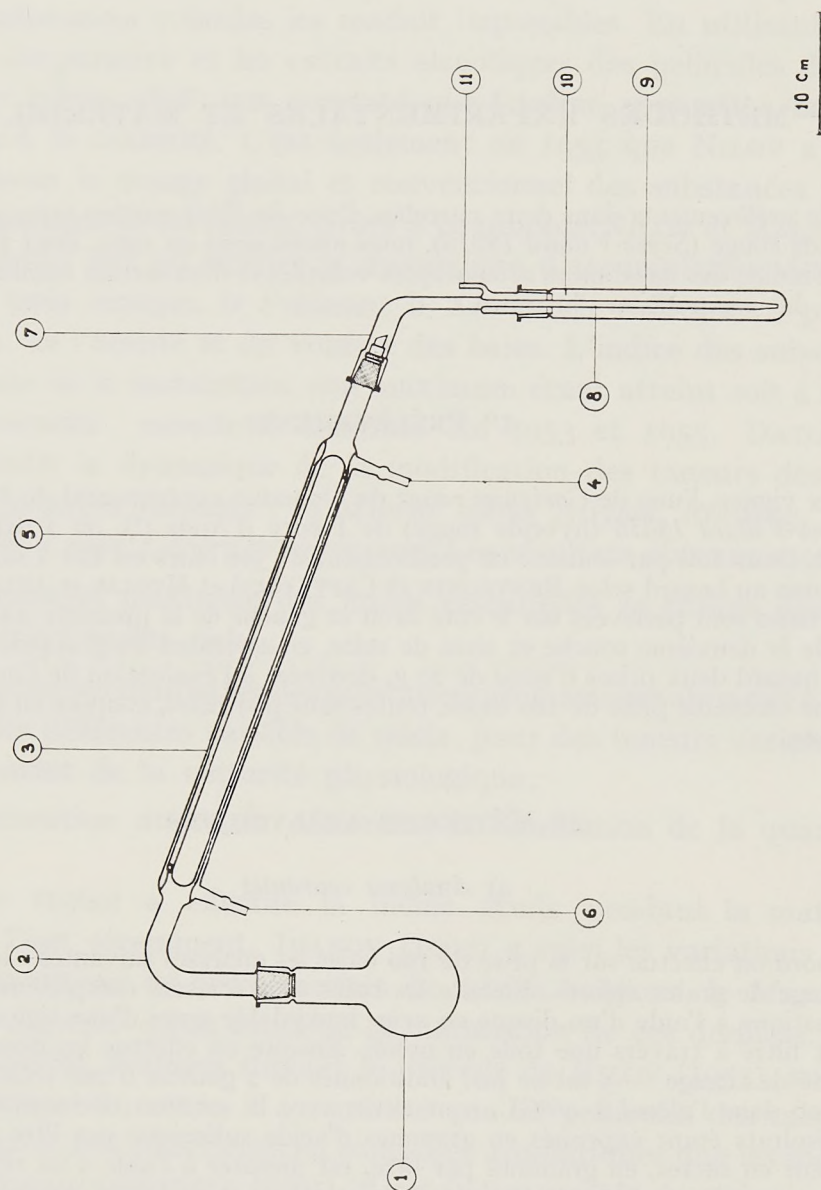


FIG. 1. — Appareil de distillation

— α Appareil de distillation.

L'appareil de distillation, spécialement construit (Éts LEGALLAIS, Montpellier) (fig. 1), se compose d'un ballon à fond rond de 250 ml de capacité avec rodage et d'un réfrigérant à double chemise, incliné à 45°, comportant deux rodages. Le rodage inférieur reçoit un tube coudé pénétrant dans un récipient cylindrique de 60 ml de capacité totale. Ce dernier est muni dans la partie supérieure d'un repère (rô) correspondant au volume de 55 ml. Le ballon distillatoire, muni de préférence d'un brise-mousse, est posé sur une plaque métallique à maille fine à son tour disposée sur une plaque ronde d'amiante de 17 cm de diamètre ayant une ouverture circulaire de 6,0-6,5 cm de diamètre.

— β Mode opératoire.

1° Solutions nécessaires :

- Solution sulfochromique : Dissoudre 50 g de bichromate de potassium (pour analyses, R. P. Sté Prolabo) dans 500 ml d'acide sulfurique concentré, densité 1,84 (pour analyses R.P., Sté Prolabo) ; après refroidissement du mélange porter à un litre avec de l'eau distillée ;
- Solution aqueuse d'iodure de potassium (pour analyses R.P., Sté Prolabo) à 10 p. 100 ;
- Solution aqueuse d'hyposulfite de sodium (pour analyses R.P., Sté Prolabo) 0,2 N ;
- Empois d'amidon à 1 p. 100, dans l'eau distillée.

2° Protocole expérimental.

Tout d'abord on introduit dans le récipient cylindrique (9), à l'aide d'une pipette de précision, 5 ml de mélange sulfochromique. Ensuite, on écrase sommairement une prise d'essai de 10 g de baies sans leurs pédicelles dans un bécher en matière plastique au moyen d'un disque en acier inoxydable surmonté d'une tige également en acier inoxydable. Les raisins écrasés sont transvasés soigneusement dans le ballon distillatoire avec 150 ml d'eau distillée et quelques grains de pierre ponce.

En utilisant les ballons distillatoires sans brise-mousse il est impossible de dépasser le poids de 20 g de baies à cause de la formation de mousse et du passage du liquide dans le distillat.

La distillation du volume de 50 ml demande 20-25 minutes. NILOV (1953) conseille de vider le réfrigérant juste 1-2 minutes avant la fin de l'opération pour éliminer les gouttelettes du distillat retenues sur les parois. Ensuite le contenu du tube-récepteur est versé, avec les eaux de lavage, dans un bécher de 100 ml que l'on chauffe, couvert avec un verre de montre, au bain-marie bouillant pendant une heure pour parfaire l'oxydation des substances volatiles. Le liquide refroidi est transvasé dans un erlenmeyer d'un litre bouché à l'émeri, on y ajoute 25 ml d'une solution d'iodure de potassium à 10 p. 100.

La fiole bouchée est laissée au repos pendant 3 minutes. Ensuite, on ajoute assez d'eau distillée pour avoir un volume de 300-350 ml et on titre à l'aide de solution d'hyposulfite de sodium 0,2 N jusqu'à la coloration jaune ; on ajoute ensuite 1 ml d'empois et on titre lentement jusqu'à l'apparition d'une coloration émeraude vert-clair, stable pendant quelques minutes. Il est à remarquer qu'après addition d'iodure de potassium la fiole doit être bien fermée afin d'éviter la perte des vapeurs d'iode. NILOV (1953) conseille l'emploi d'un bouchon spécial et le titrage rapide au début. A notre avis, la technique du dosage iodométrique peut être améliorée dans ses détails. Néanmoins, nous avons préféré l'utiliser pour le moment sans modifications afin de rendre possible la comparaison des résultats obtenus au cours d'autres études semblables.

L'essai à blanc, exécuté dans les mêmes conditions avec le volume d'eau correspondant à celui du distillat, permet de connaître la quantité de bichromate consommé. La teneur en substances volatiles s'exprime en ml de solution d'hyposulfite de sodium 0,2 N. Le volume de cette solution pour 100 g de baies constitue ce que nous appelons l'indice des substances volatiles du raisin.

III. — RÉSULTATS OBTENUS

Les résultats obtenus avec les deux cépages rouges, le *Carignan* et le *Seyve-Villard 18315*, sont consignés dans les deux graphiques sous forme de cinq courbes concernant les glucides, l'acidité, le pH, le poids de 100 grains et l'indice des substances volatiles. A cela s'ajoute les indications concernant les pourcentages des grains colorés dans les échantillons soumis aux analyses.

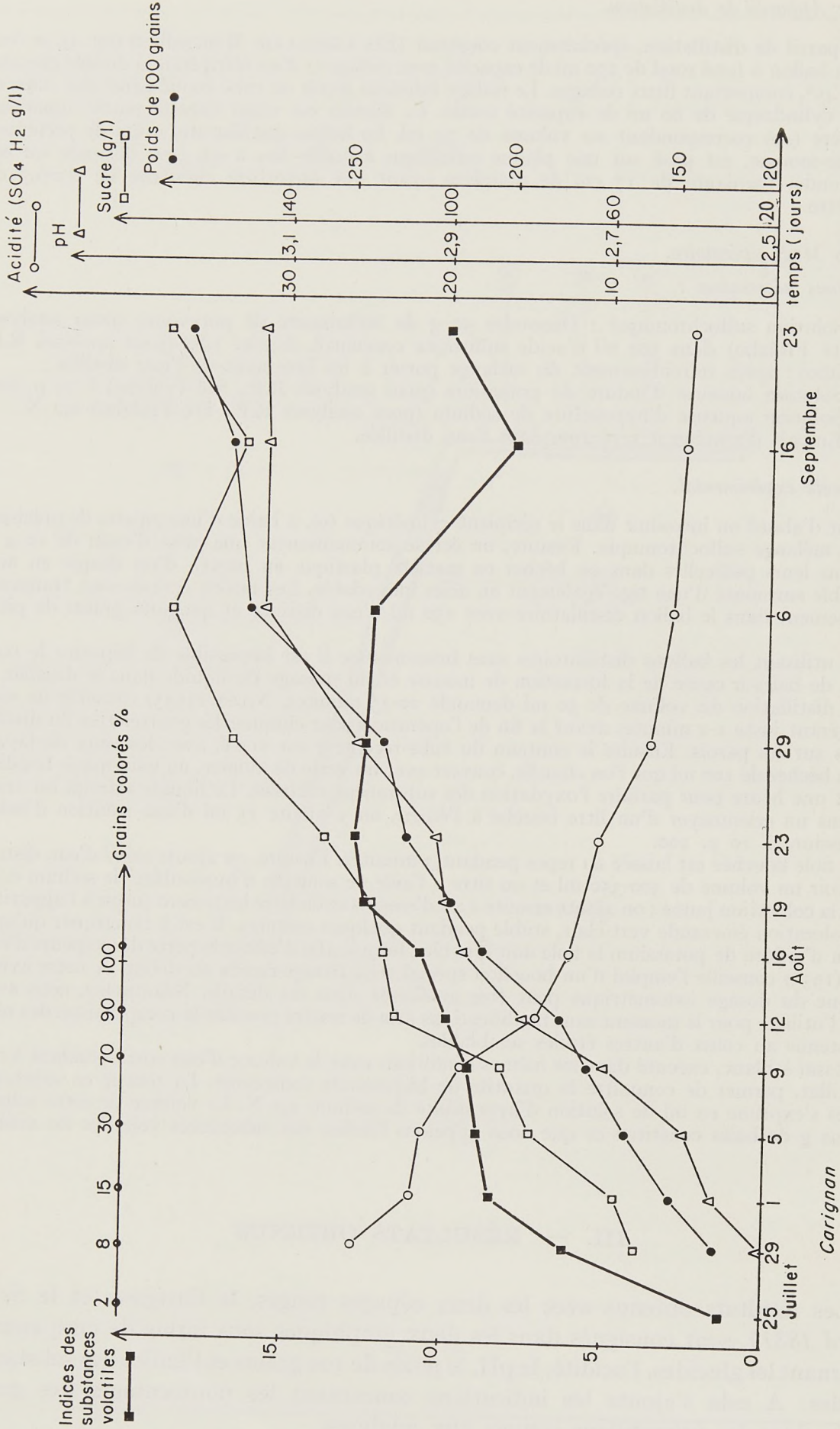


FIG. 2. — Évolution de la maturation du raisin Carignan

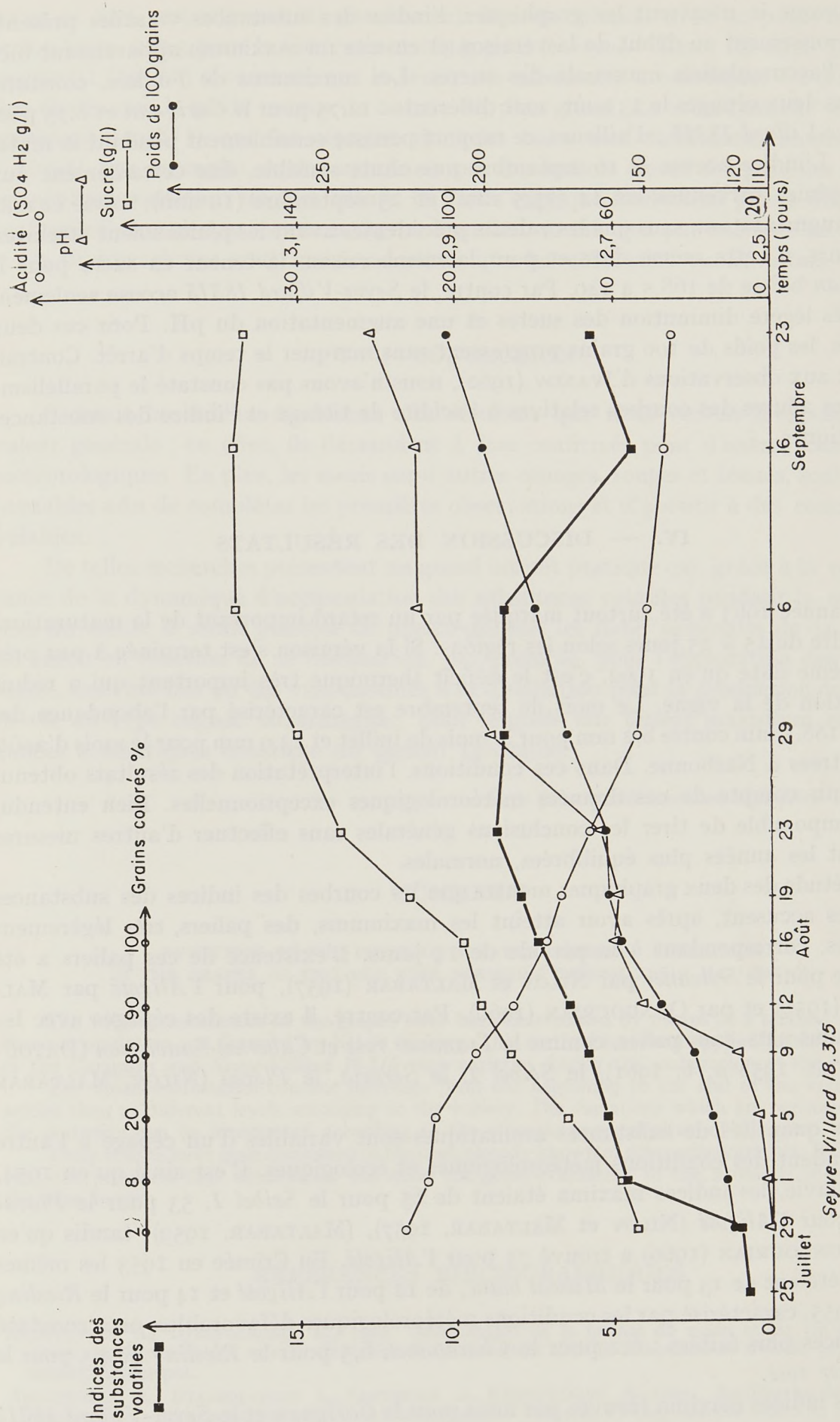


FIG. 3. — Évolution de la maturation du raisin Seyve-Villard 18315

Comme le montrent les graphiques, l'indice des substances volatiles présente un accroissement au début de la véraison et ensuite un maximum apparaissant bien avant l'accumulation maximale des sucres. Les maximums de l'indice, constatés pour les deux cépages le 23 août, sont différents : 12,75 pour le *Carignan* et 8,75 pour le *Seyve-Villard 18315* ; d'ailleurs, ce rapport persiste sensiblement pendant la maturation. L'indice accuse le 16 septembre une chute sensible, due certainement aux fortes pluies survenues les 14 (75,5 mm) et 15 septembre (19 mm), suivie ensuite d'une augmentation, sans que les valeurs précédentes avant les pluies soient atteintes. D'ailleurs, à cette même date et pour la même raison, la teneur en sucre pour le *Carignan* baisse de 168,5 à 149. Par contre, le *Seyve-Villard 18315* accuse seulement une très légère diminution des sucres et une augmentation du pH. Pour ces deux cépages, les poids de 100 grains progressent sans marquer le temps d'arrêt. Contrairement aux observations d'IVANOV (1962), nous n'avons pas constaté le parallélisme entre les allures des courbes relatives à l'acidité de titrage et l'indice des substances aromatiques.

IV. — DISCUSSION DES RÉSULTATS

L'année 1963 a été surtout marquée par un retard important de la maturation, de l'ordre de 15 à 25 jours selon les régions. Si la véraison s'est terminée à peu près à la même date qu'en 1962, c'est le déficit thermique très important qui a réduit l'évolution de la vigne. Le mois de septembre est caractérisé par l'abondance des pluies, 188,5 mm contre 8,2 mm pour le mois de juillet et 23,9 mm pour le mois d'août, enregistrées à Narbonne. Dans ces conditions, l'interprétation des résultats obtenus doit tenir compte de ces données météorologiques exceptionnelles. Bien entendu, il est impossible de tirer les conclusions générales sans effectuer d'autres mesures pendant les années plus équilibrées, normales.

L'étude des deux graphiques montre que les courbes des indices des substances volatiles accusent, après avoir atteint les maximums, des paliers, très légèrement inclinées, correspondant à la période de 14 jours. L'existence de ces paliers a été signalée pour le *Sylvaner* par NILOV et MALTABAR (1957), pour l'*Aligoté* par MALTABAR (1959) et par OUNGOURIAN (1960). Par contre, il existe des cépages avec les maximums nets, sans palier, comme le *Traminer rose* et *Cabernet-Sauvignon* (DATOUNASCHVILI, 1958 a, b, 1961), le *Seibel 1*, le *Serexia*, le *Plavaï* (NILOV, MALTABAR 1957).

Les quantités de substances aromatiques sont variables d'un cépage à l'autre et dépendent des conditions météorologiques et écologiques. C'est ainsi qu'en 1954, en Moldavie, les indices maxima étaient de 65 pour le *Seibel 1*, 53 pour le *Plavaï* et 56 pour l'*Aligoté* (NILOV et MALTABAR, 1957), (MALTABAR, 1959), tandis qu'en 1952 OUNGOURIAN (1960) a trouvé 75 pour l'*Aligoté*. En Crimée en 1953 les mêmes indices étaient de 13 pour le *Muscat blanc*, de 12 pour l'*Aligoté* et 14 pour le *Riesling* et en 1955, caractérisé par les conditions météorologiques défavorables, on a constaté des indices plus faibles : 6,2 pour le *Chardonnay*, 6,5 pour le *Riesling* et 4,5 pour le *Traminer rose*.

Les indices maxima trouvés par nous pour le *Carignan* et le *Seyve-Villard 18315*

(12,75 et 8,75 respectivement) paraissaient être en relation avec les poids moyens de 100 baies, 232 g pour le *Carignan* et 163 g pour le *Seyve-Villard*. En effet, DATOUNASCHVILI (1958 *a*) a constaté que la teneur en substances aromatiques est d'autant plus élevée que le poids moyen de la baie est plus grand. Le même auteur souligne également (1958 *b*) que les cépages, dont les baies sont faiblement aromatiques (l'*Aligoté*, par exemple), sont caractérisés par des indices élevés comparables à ceux des cépages possédant un fort arôme. Ce fait s'explique facilement par la différence qualitative des substances aromatiques. En effet, on sait que par exemple les alcools et les hydrocarbures sont moins odorants que les aldéhydes ou les esters.

V — CONCLUSION

Il serait hasardeux de donner aux résultats que nous venons d'exposer, une valeur générale ; en effet, ils demandent à être confirmés pour d'autres conditions météorologiques. En plus, les essais sur d'autres cépages, rouges et blancs, sont indispensables afin de compléter les premières observations et d'aboutir à des conclusions valables.

De telles recherches présentent un grand intérêt pratique car, grâce à la connaissance de la dynamique d'accumulation des substances volatiles pendant la maturation du raisin, il serait possible de mieux préciser les dates optimales de la récolte du raisin en fonction de sa destination, par exemple, pour l'élaboration des jus de raisin, des vins fins ou des vins destinés à la distillation pour la production des eaux-de-vie du type cognac ou armagnac, pour lesquels une teneur maximum en substances aromatiques constitue un facteur favorable.

Reçu pour publication en septembre 1964.

SUMMARY

EVOLUTION OF THE INDEX OF VOLATILE AROMATIC SUBSTANCES IN THE GRAPES OF TWO RED VINE VARIETIES DURING THEIR MATURATION

The volatile substances of the grapes have been determined by means of a method using the chromic oxidation put forward by NILOV in 1953. This method has been applied to the red grapes of the *Carignan* and *Seyve-Villard 18 315* vine varieties during the maturation of the 1963 crop.

The volatile-substance content increases from the beginning to the end of the veraison and settles then at different levels according to the variety. The variations which are registered during the maturity can be interpreted according to the climatic particularities of the year.

These results have been compared to the ones already known of other vine varieties. It is believed that the products thus determined will allow the gross evaluation of the aromatic substances in the vine berry.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AROUTUNIAN A., DJANPOLADIAN L., 1959. Amélioration de la qualité du raisin et du vin par fertilisation des vignobles (en russe). *Évolution de l'Horticulture et de la Viticulture en Crimée*, 367-377, Krimizdat, Simferopol.
- AROUTUNIAN A., DJANPOLADIAN L., SAMVELIAN A., KHATCHARIAN A., 1960. Fertilisation des vignobles comme moyen d'augmenter la qualité du vin (en russe). *Vinodélié i Vinogradarstvo U.R.S.S.*, n° 3, 24-27.

- BENVEGNIN L., CAPT E., 1955. L'échantillonnage à la vigne pour l'évaluation de la maturité du raisin sur cep. *Rev. Rom. Agric. Vitic. Arbor.*, n° 2, 13.
- DATOUNASCHVILI E., 1958-a. Dynamique des modifications de la quantité des huiles essentielles au cours de la maturation des baies de raisin (en russe). *Bull. Naoutch-Techn. Inform.* (Bull. Inform. Sc. Tech.), Inst. Magaratch, n° 1, 32-39.
- DATOUNASCHVILI E., 1958-b. Étude des substances aromatiques du raisin (en russe). *Troudy Vs Naouch Issled Inst. Vin. Vinogr. Magaratch.* (Trav. Inst. Rech. Scient. Œnol. Viticulture, Magaratch), 6, n° 2, 16-23.
- DATOUNASCHVILI E., 1961. Huiles essentielles de la vigne (en russe). *Troudy Konfer. bioch. vinod.* (Trav. Conférence sur la Bioch. œnol.), 1960, 45-51. Pischepromizdat, Moscou.
- DEIBNER L., RIFAI H., 1958. Variation de l'indice des substances volatiles des jus de raisin au cours de leur conservation. *Ann. Technol. agric.*, 7, 21-29.
- GIRARD A., LINDET L., 1896. Recherches sur la composition des raisins des principaux cépages de France. *Rev. Vitic.*, 6, 173-186.
- GIRARD A., LINDET L., 1898. Recherche sur le développement progressif de la grappe de raisin. *Rev. Vit.*, 9, 737-744.
- HUGLIN P., JULLIARD B., 1955. Étude sur la morphologie, la phénologie et la productivité des principaux cépages de *V. Vinifera* L. cultivés en Alsace. *Ann. Amel. Plantes, I.N.R.A.*, 5, n° 1, 5-51.
- HUGLIN P., JULLIARD B., 1959. Contrôle de la maturation du raisin par le prélèvement de baies. *Progr. Agric. Vitic.*, 152, 11-16, 37-41.
- IVANOV T., 1962. Substances aromatiques du raisin des variétés *Muscat rouge* et *Proslava* (en bulgare). *Trav. Sc. Inst. Technol. Sup. Ind. Aliment., Plovdiv*, 9, 67-76.
- JAULMES P., 1951. *Analyse des vins*, 524, Poulain éd. Montpellier.
- MALTABAR V., 1959. Les variétés du raisin et les dates de la vendange pour la production des cognacs en Moldavie (en russe). *Troudy Mold. Naoutch. Issled Inst. Sadov, Vinograd. Vinod.* (Trav. Inst. Moldavie Rech. Scient. Hortic. Vitic. Œnol.), 6, 187-211.
- NILOV V., 1953. Méthode pour le dosage des substances aromatiques dans le raisin, les marcs et le moût (en russe). *Troudy Vses. Naoutch. Issl. Inst. Vinod. Vinogr. Magaratch*, 4, 165-168.
- NILOV V., MALTABAR V., 1957. Appréciation des variétés de raisin pour la production du cognac et pour la détermination de la date de la récolte (en russe). *Troudy Vses. Naoutch. Izled. Inst. Vinod. Vinogr.*, Magaratch, fasc. 5, 5-16.
- OUNGOURIAN P., 1960. Maturation du raisin dans la partie méridionale de la Moldavie et son influence, sur la qualité des vins (en russe). *Sadov. Vinogr. Vinod. Mold.* (Hortic. Vitic. Œnol. de Moldavie), 15, n° 1, 45-48.
- SAMVELYAN A., 1961. Moyens de régulation de la composition du vin par le traitement des vignobles au moyen des procédés agrotechniques (en russe). *Troudy Konferenzii po bioch. vinodelya.* (Trav. Conférence sur la bioch. œnol.), 1960, 37-44, Moscou, Pischepromizdat.

LIBÉRATION ENZYMATIQUE DE LA LYSINE DES POUDRES DE LAIT OBTENUES PAR PULVÉRISATION

M. LHUISSIER et Évelyne BIETTE

*Laboratoire d'Étude des Qualités biologiques des Aliments de l'Homme,
Centre national de Recherches zootechniques, Jouy-en-Josas (Seine-et-Oise)*

SOMMAIRE

La vitesse de libération enzymatique de la lysine de 26 échantillons de poudres de lait (grasses ou maigres) obtenues par pulvérisation a été comparée à celle de 10 échantillons de lait pasteurisé du commerce (entier ou écrémé).

1° Dans les conditions expérimentales utilisées, les résultats obtenus ne diffèrent pas significativement pour les deux groupes de produits. Ainsi, après 8 heures d'attaque pepsique suivies de 15 heures d'hydrolyse trypsique, les pourcentages de la lysine totale dosés atteignent :

72,0 $\pm$ 8,0 pour les poudres,

77,4 $\pm$ 2,3 pour les laits pasteurisés, (8,0 et 2,3 sont des écarts types).

On voit cependant que la dispersion des valeurs individuelles est plus grande dans le cas des poudres.

2° Aucune différence de comportement n'est observée entre poudres grasses et poudres maigres.

3° Il existe une corrélation (significative au seuil de $P = .05$) entre le pourcentage de lysine libérée des poudres et leur valeur biologique comme sources de protéines pour le Rat en croissance.

4° En définitive, les résultats obtenus s'accordent avec ceux du test biologique (évaluation du coefficient d'utilisation digestive des protéines et de leur valeur biologique) : dans la plupart des cas, la valeur nutritive des protéines du lait paraît assez peu affectée par les techniques de séchage par pulvérisation, telles qu'on les applique actuellement.

INTRODUCTION

Au cours d'une récente enquête sur la valeur nutritive des poudres de lait pulvérisées (poudres *spray*), CAUSERET et HUGOT (1962) ont constaté que l'utilisation digestive des protéines de ces poudres était égale à celle des protéines du lait pasteurisé, mais que leur valeur biologique pour le Rat en croissance était abaissée (de 8 p. 100 environ, la différence étant significative au seuil de $P = .01$).

Toutefois, il n'est pas impossible que certaines détériorations de la valeur nutritive des protéines du lait sous l'action de la chaleur ne soient pas décelées par le test biologique tel qu'il a été conduit. On sait en effet qu'au cours du séchage du lait, une fraction de la lysine peut se trouver détruite, et une autre fraction bloquée

par réaction de Maillard (MAURON et *al.*, 1955 ; MAURON et MOTTU, 1958). Or, moins d'être particulièrement accusé, ce double phénomène risque de rester sans influence sur la valeur biologique des protéines du lait, puisque leur premier facteur limitant n'est pas la lysine, mais la méthionine.

Il nous a donc paru intéressant de déterminer la vitesse de libération enzymatique de la lysine d'un certain nombre de poudres de lait, et de laits pasteurisés utilisés comme produits de référence ⁽¹⁾. En même temps, nous avons aussi déterminé la vitesse de libération enzymatique de l'azote aminé pour tenir compte du fait que la réaction de Maillard peut concerner des acides aminés essentiels autres que la lysine. Enfin nous avons cherché s'il existait une corrélation entre les résultats de nos déterminations *in vitro* et ceux du test biologique.

PROTOCOLE EXPÉRIMENTAL

1^o Essai préliminaire

Envisageant de déterminer la vitesse de libération enzymatique de la lysine et de l'azote aminé des poudres à étudier, il nous a paru intéressant d'évaluer les indications fournies par ces deux tests en les appliquant tout d'abord à deux produits susceptibles d'être considérés, en première approximation, comme extrêmes :

— une poudre *spray* de fabrication récente présentant une efficacité biologique élevée (valeur biologique pour le Rat en croissance : 87 ; utilisation protéique nette : 78) ;

— une poudre *Hatmaker* conservée à l'usine pendant 6 mois, présentant une teinte brune et ayant une efficacité biologique relativement basse (valeur biologique pour le Rat en croissance : 73 ; utilisation protéique nette : 67).

Sur ces deux poudres, la lysine totale a été dosée après hydrolyse acide du lait en milieu chlorhydrique 3 N, pendant 6 heures à + 108°C, en tube scellé sous vide. D'autre part, la lysine libérée enzymatiquement et l'azote aminé ont été dosés :

— après 15 heures d'hydrolyse pepsique ;

— après 15 heures d'hydrolyse pepsique suivies de 1, 2, 4 (ou 5) et 8 heures d'hydrolyse trypsique.

Modalités de l'hydrolyse enzymatique

Un gramme de lait en poudre, mis en suspension dans 50 ml d'acide chlorhydrique N/10 contenant 1 mg de pepsine « Difco » 1/10 000, est maintenu, sous toluène, au bain-marie à + 45°C pendant 15 heures. Un dispositif approprié assure une agitation permanente. Après neutralisation par la soude normale, la température est ramenée à + 40°C et on ajoute 25 ml de phosphate disodique 0,1 M contenant 12,5 mg de trypsine « Difco » 1/250. Des échantillons sont prélevés périodiquement et l'hydrolyse est poursuivie pendant 8 heures. Il faut remarquer que les produits de l'hydrolyse s'accumulant dans le milieu, peuvent freiner celle-ci.

Les dosages de lysine sont effectués par voie microbiologique en utilisant *Leuconostoc mesenteroides* P 60 sur milieu de Dünn ⁽²⁾. L'azote total est dosé par la mé-

⁽¹⁾ Les poudres que nous avons étudiées ayant été prélevées dans des régions très diverses, il nous était matériellement impossible d'utiliser comme produits de référence les laits frais correspondants. Pour la même raison, il n'était pas possible d'évaluer la proportion de lysine détruite au cours des traitements subis.

⁽²⁾ Ce microorganisme, comme tous ceux qui permettent de doser la lysine, utilise probablement, outre la lysine libre, la lysine de certains petits peptides. Il convient donc de faire quelques réserves sur la signification de l'expression « lysine libérée » que, par commodité, nous continuerons néanmoins à employer dans ce travail.

thode de Kjeldahl, l'azote aminé par la méthode manométrique de Van Slyke au nitrite de sodium.

Les résultats de l'essai préliminaire figurent dans le tableau 1. Cet essai met en évidence l'intérêt primordial de la détermination du pourcentage de lysine totale des poudres libérée par voie enzymatique au cours de l'hydrolyse trypsique.

TABLERAU I

Libération relative de l'azote aminé et de la lysine dans un lait spray et un lait Hatmaker brun.

Durée de l'hydrolyse trypsique (heures)		0	1	2	4	8
$\frac{\text{N aminé libéré}}{\text{N total}} \times 100$	spray	9,8	26,4	27,8	29,2	31,4
	Hatmaker .	7,0	22,7	24,2	25,9	27,8
$\frac{\text{Lysine libérée}}{\text{Lysine totale}} \times 100$	spray ...	0	52,0	58,3	63,4	65,5
	Hatmaker .	0	31,1	35,1	40,0	45,2
$\frac{\text{N aminé lib.-N lys. lib.}}{\text{N total}} \times 100$	spray	9,7	20,6	21,7	22,6	24,0
	Hatmaker .	7,1	19,7	20,8	22,4	23,5

Le pourcentage de l'azote total libéré sous forme d'azote aminé semble moins susceptible de mettre en évidence des différences entre les laits. Le calcul du rapport

$$\frac{\text{N aminé libéré} - \text{N lysine libérée}}{\text{N total}} \times 100$$

suggère d'ailleurs que dans le cas de la poudre Hatmaker, le retard observé dans la libération de l'azote aminé est dû entièrement ou presque entièrement au retard de la libération de la lysine.

2° Détermination effectuées sur les poudres spray

L'évaluation de la vitesse de libération enzymatique de la lysine a porté sur 26 échantillons de 11 provenances différentes, comprenant 10 poudres grasses (à 26 p. 100 de matières grasses) et 16 poudres maigres. Des déterminations doubles ou triples ont été effectuées sur chaque échantillon.

L'évaluation de la vitesse de libération de l'azote aminé qui, d'après l'essai préliminaire, apparaît moins intéressante, n'a été effectuée que sur une partie des échantillons, choisis au hasard (4 poudres grasses et 10 poudres maigres).

Enfin, le premier test a été appliqué à 10 échantillons de lait pasteurisé, entier ou écrémé au laboratoire, provenant du commerce (lait pasteurisé en carafe, daté du jour). La détermination de la vitesse de libération de l'azote aminé a été omise sur ces produits.

Les conditions de la digestion enzymatique et les méthodes analytiques ont été les mêmes que pour l'essai préliminaire.

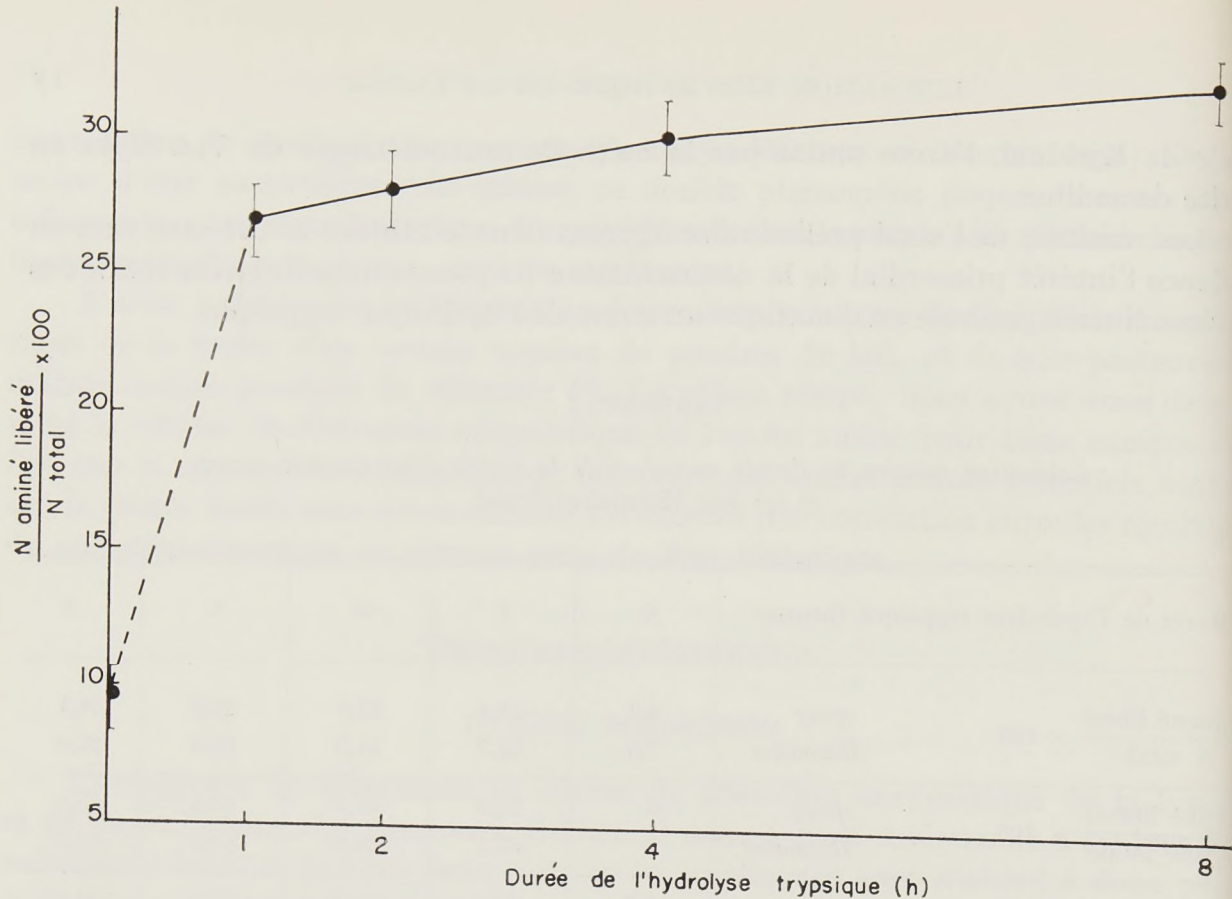


FIG. 1. — Évolution du rapport $\frac{N \text{ aminé libéré}}{N \text{ total}} \cdot 100$ au cours de l'hydrolyse trypsique (après 15 heures d'hydrolyse pepsique) de poudres de lait (les écarts types ont été figurés).

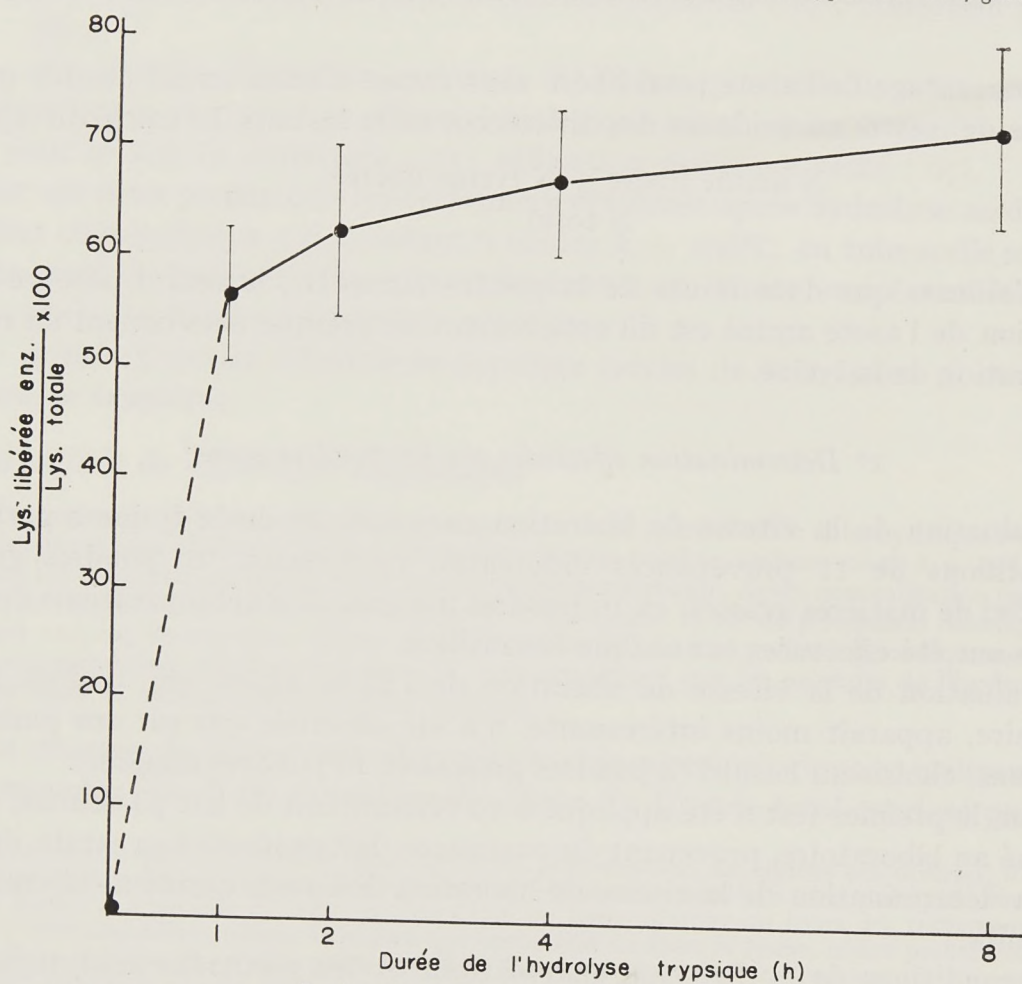


FIG. 2. — Évolution du rapport $\frac{\text{Lysine libérée enzymatiquement}}{\text{lysine totale}} \cdot 100$ au cours de l'hydrolyse trypsique (après 15 heures d'hydrolyse pepsique) de poudre de lait (les écarts types ont été figurés).

Conditions de la fabrication des poudres

a) Pasteurisation : avec un appareil à plaques dans la grande majorité des cas, avec appareil tubulaire dans quelques cas seulement ; les températures variant de 76 à 91°C.

b) Stockage du lait pasteurisé pendant des durées variant d'une à plusieurs heures, à froid ou à chaud et, dans ce dernier cas, jusqu'à 80°C.

c) Concentration : généralement avec concentrateur à double effet, parfois à triple effet. Températures :

— dans le premier cas : de 62 à 79° et de 40 à 50°C ;

— dans le second cas : de 64 à 70°, de 55 à 60° et de 45 à 47°C.

d) Atomisation : entrée de l'air à température variable de 160 à 185°C, sortie de la poudre de 75 à 100°C (généralement de l'ordre de 85°C).

Remarques : les conditions de travail sont éminemment variables d'une usine à l'autre et, parfois, dans la même usine d'un jour à l'autre, essentiellement en ce qui concerne les durées de stockage.

RÉSULTATS

Dans les laits étudiés il y a $8,08 \pm 0,02$ g de lysine totale pour 16 g d'azote. (0,02 est un écart-type). Cette valeur est sensiblement égale à celle qui est généralement attribuée au lait cru.

Les figures 1 et 2 permettent de suivre la libération de l'azote aminé et de la lysine des poudres, après hydrolyse pepsique et 1, 2, 4 (ou 5) et 8 heures d'hydro-

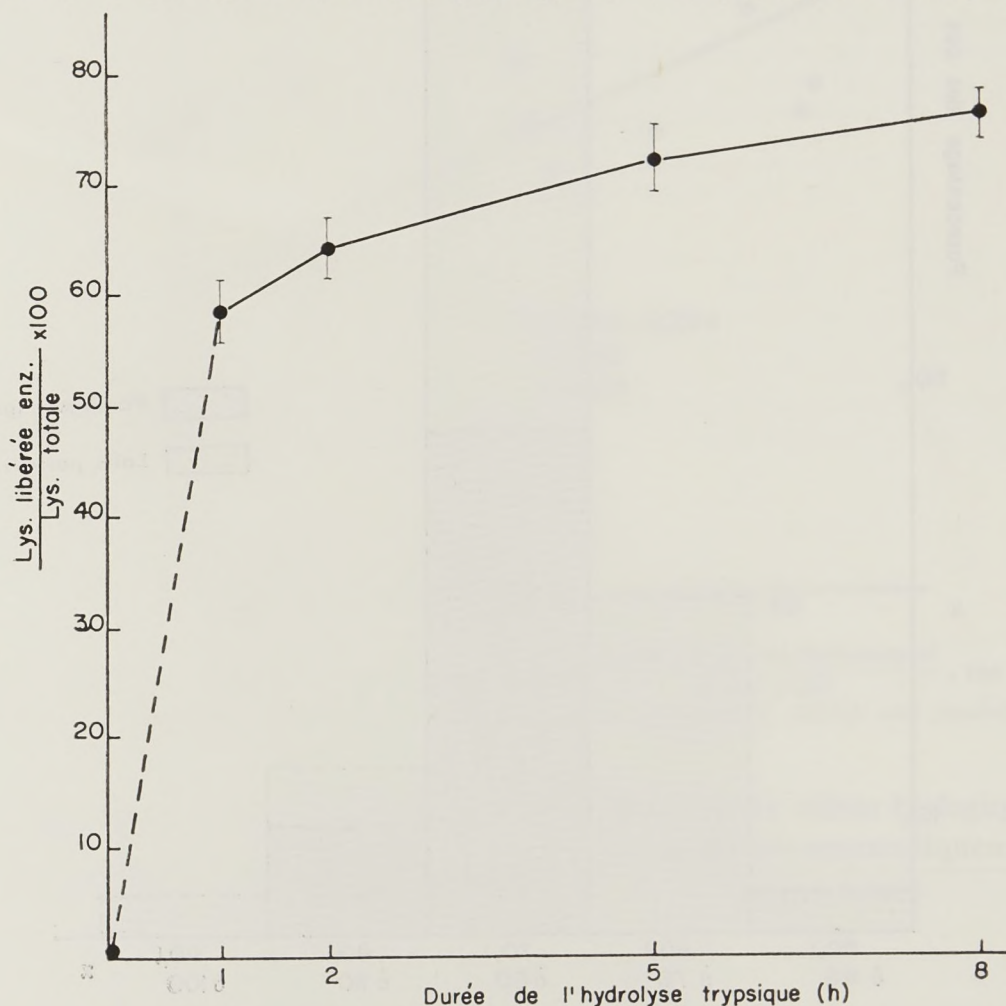


FIG. 3. — Évolution du rapport $\frac{\text{Lysine libérée enzymatiquement}}{\text{lysine totale}} \cdot 100$ au cours de l'hydrolyse trypsique (après 15 heures d'hydrolyse pepsique) de laits pasteurisés (les écarts types ont été figurés).

lyse trypsique. Poudres grasses et poudres maigres n'ayant pas des comportements significativement différents ne sont pas distinguées.

La figure 3 permet de suivre la libération de la lysine des laits pasteurisés.

DISCUSSION

1° En moyenne, la vitesse de libération de la lysine apparaît légèrement plus lente avec les poudres qu'avec les échantillons de lait pasteurisé : après 15 heures d'hydrolyse pepsique suivie de 8 heures d'hydrolyse trypsique, la différence est de l'ordre de 7 p. 100. Toutefois, cette différence n'est pas significative. Cet abaissement est du même ordre de grandeur que celui qui existe entre les valeurs biologiques, mesurées sur le Rat en croissance, de ces deux types de laits (CAUSERET et HUGOT, 1962).

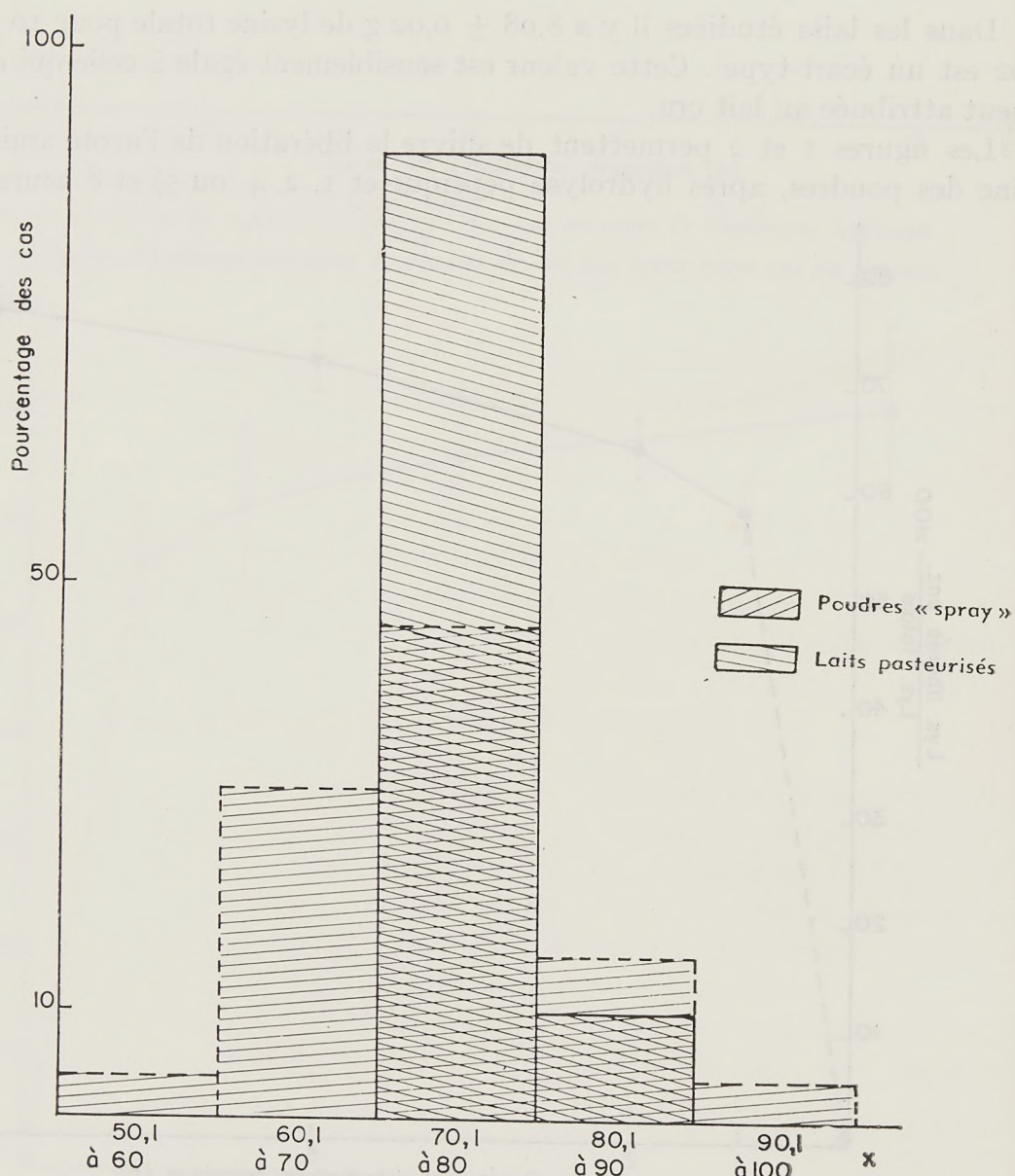


FIG. 4. — Distribution de fréquences du rapport $x = \frac{\text{Lysine libérée enzymatiquement}}{\text{lysine totale}} \cdot 100$ (valeur après 8 heures d'hydrolyse trypsique) pour les poudres « spray » et pour les laits pasteurisés de référence

D'autre part, il est intéressant de souligner que la dispersion des résultats est plus grande dans le cas des poudres que dans celui des laits pasteurisés. La figure 4 précise l'ampleur de ce phénomène.

En dépit de cette dispersion, il paraît possible de conclure que la fraction de la lysine bloquée par réaction de Maillard à la suite du séchage par atomisation est assez faible dans la plupart des poudres étudiées (au moins pour le micro-organisme utilisé).

2° Il n'a pas été possible d'établir de corrélation entre les conditions de fabrication des différentes poudres et les résultats de nos tests. En particulier, le comportement des échantillons qui avaient subi des traitements thermiques relativement sévères (stockage prolongé du lait pasteurisé à chaud, ou températures de concentration et d'atomisation plus élevées) n'était pas significativement différent de celui des autres échantillons.

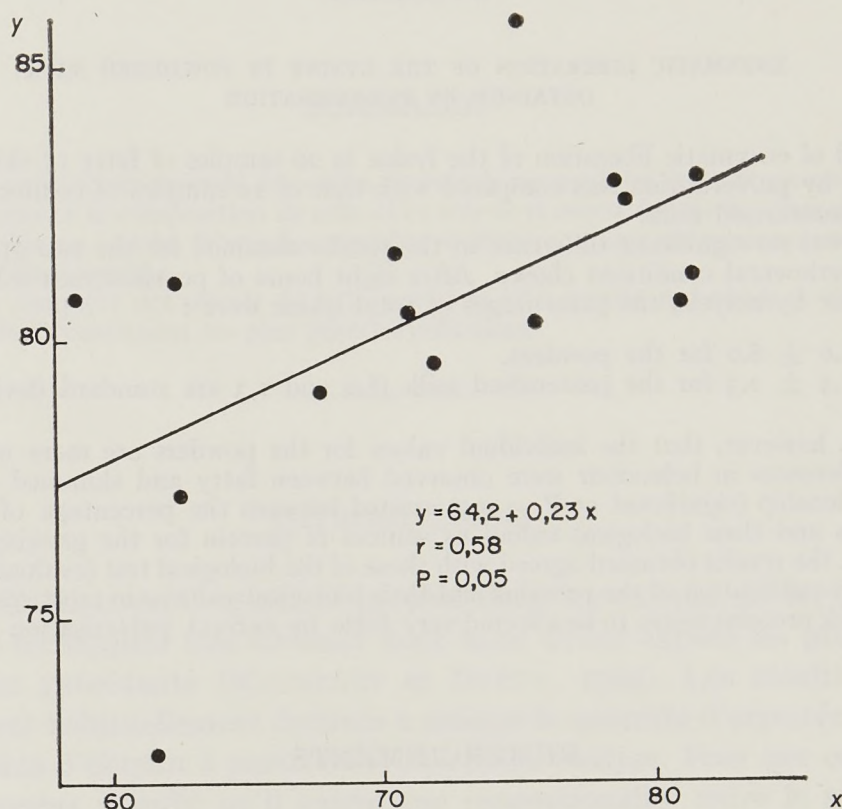


FIG. 5. — Corrélation entre le rapport $x = \frac{\text{Lysine libérée enzymatiquement}}{\text{lysine totale}} \cdot 100$ (valeur après 8 heures d'hydrolyse tryptique) et la valeur biologique y , relatifs aux poudres de lait.

3° La figure 5 montre la relation qui existe entre la valeur biologique (y) des poudres étudiées et la valeur finale x du rapport $\frac{\text{lysine libérée enzymatiquement}}{\text{lysine totale}} \cdot 100$.

On a :

$$y = 64,2 + 0,23 x$$

avec un coefficient de corrélation $r = 0,58$. Sans être très forte, la corrélation est cependant significative au seuil de $P = .05$.

Il est vraisemblable que si le régime des rats avait été supplémenté en méthionine, cette corrélation aurait été plus significative, car le lait de vache est, pour le Rat, déficitaire en méthionine, ce déficit pouvant masquer partiellement des différences de disponibilité de la lysine (MAURON et MOTTU, 1958).

4° En définitive, les études *in vitro* rapportées dans le présent mémoire — études qui sont basées sur des tests plus rapides et plus simples que la détermination de l'efficacité biologique sur animaux — confirment les résultats du travail antérieur de CAUSERET et HUGOT (1962) : dans la plupart des cas la valeur nutritive des protéines du lait paraît assez peu affectée par les techniques de séchage par pulvérisation, telles qu'on les applique actuellement.

Reçu pour publication en octobre 1964.

SUMMARY

ENZYMATIC LIBERATION OF THE LYSINE IN POWDERED MILK OBTAINED BY PULVERISATION

The speed of enzymatic liberation of the lysine in 26 samples of fatty or skimmed powdered milk obtained by pulverisation was compared with that of 10 samples of commercial unskimmed or skimmed pasteurised milk.

1° There was no significant difference in the results obtained for the two groups of products under the experimental conditions chosen. After eight hours of pepsic attack followed by fifteen hours of trypsin hydrolysis, the percentages of total lysine were :

72.0 $\pm$ 8.0 for the powders,

77.4 $\pm$ 2.3 for the pasteurised milk (8.0 and 2.3 are standard deviations).

It is seen, however, that the individual values for the powders are more widely dispersed.

2° No differences in behaviour were observed between fatty and skimmed powders.

3° A relationship (significant at $P = .05$) existed between the percentage of lysine liberated in the powders and their biological values as sources of protein for the growing rat.

4° Finally, the results obtained agreed with those of the biological test (evaluation of the coefficient of digestive utilisation of the proteins and their biological value) : in most cases, the nutritive value of the milk proteins seems to be affected very little by current pulverisation drying techniques.

REMERCIEMENTS

Nous adressons nos vifs remerciements à M^{lle} BEJAMBES, directeur de recherches à l'I. N. R. A., et à M. VASSAL, ingénieur à l'I. N. R. A., qui assura la collecte des échantillons de lait utilisés dans cette étude.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CAUSERET J. et HUGOT D., 1962. Utilisation digestive et valeur biologique des protéines de lait en poudre obtenus par atomisation. Communication présentée au *First International Congress of Food Science and Technology* (Londres, sept. 1962). Publiée en 1964. In LEITCH J., M., (ed.), *Food Science and Technology*, vol. 3, Quality, Analysis and Composition of Foods (group C papers), Gordon and Breach Science publishers, New York.
- MAURON J., MOTTU F., BUJARD E. et EGLI R. H., 1955. The availability of lysine, methionine and tryptophan in condensed milk and milk powder. *In vitro* digestion studies. *Arch. Biochem.*, **59**, 433-451.
- MAURON J., MOTTU F., 1958. Relationship between *in vitro* lysine availability and *in vivo* protein evaluation in milk powders. *Arch. Biochem.*, **77**, 312-327.

SÉPARATION, IDENTIFICATION, ÉVALUATION QUANTITATIVE DE L'ERGOSTÉROL ET DE SES PRÉCURSEURS DANS LA LEVURE

J. MAUGENET et J.N. MORFAUX

Station de Technologie végétale, route de Saint-Cyr, Versailles (Seine et Oise)

SOMMAIRE

Les auteurs, après avoir préparé des esters de stérols susceptibles de se trouver dans la levure, recherchent et donnent la composition de celle-ci en stérols et esters de stérols. Ceux-ci sont évalués par chromatographie en couche mince des extraits, révélation, tirage sur papier photographique et analyse avec un densitographe.

L'extraction complète des stérols de la levure et la très grande résistance à l'hydrolyse des esters de l'ergostérol constituent les plus grandes difficultés.

INTRODUCTION

La détermination de l'ergostérol présent dans les cellules de levures peut se faire avec des techniques très diverses dont nous avons exposé les principes dans une publication précédente (MAUGENET et DUPUY, 1964). Les résultats que l'on obtient ainsi sont habituellement destinés à estimer la quantité d'ergostérol cristallisé qu'il sera possible d'obtenir à partir de l'échantillon analysé. Pour que ces méthodes soient satisfaisantes il suffit qu'il existe une proportionnalité entre le test envisagé et la technique industrielle d'extraction.

Les travaux entrepris pour élucider la synthèse des stérols dans la levure ont permis de reconnaître à côté de l'ergostérol la présence de ses esters, du lanostérol et du squalène. Il a été possible de séparer par chromatographie sur colonne puis de doser ces divers composés synthétisés par des préparations dépourvues de cellules. Lorsqu'on aborde la physiologie de la levure, ces techniques sont insuffisantes. En effet, il est indispensable, avant le dosage, d'extraire les stérols des cellules en essayant de les modifier le moins possible.

Appliquée d'une façon qualitative, la chromatographie en couche mince permet de suivre l'extraction des stérols de la levure, de contrôler l'hydrolyse de ses esters et de mettre en évidence les destructions ou les modifications qui peuvent se produire au cours des traitements. Cette technique peut être rendue quantitative : elle permet

de doser l'ergostérol, ses esters et ses précurseurs. Son application a permis d'apporter quelques faits nouveaux sur la répartition et la nature des stérols présents dans la levure.

TECHNIQUES

A. Purification de l'ergostérol par cristallisations successives

L'ergostérol s'altère même lorsqu'il est conservé sous forme cristallisée et à l'obscurité, il est donc nécessaire de le purifier. Pour cela on le dissout à chaud dans l'alcool éthylique à 95°, on décolore par le charbon actif « Prolabo RP » et on filtre à chaud. Une partie de l'alcool est évaporée sous vide et la solution concentrée est mise à cristalliser pendant une nuit à -15°C . On effectue ensuite une autre cristallisation dans l'alcool en récupérant les cristaux par centrifugation puis une dernière cristallisation où les cristaux sont recueillis sur filtre et lavés à l'alcool.

Les cristaux qui se présentent en fines aiguilles blanches sont placés dans un dessiccateur sous vide et conservés ensuite à l'abri de la lumière. L'ergostérol ainsi cristallisé s'est révélé chromatographiquement pur.

B. Préparation des esters de l'ergostérol

Acétate d'ergostérol.

L'acétate a été synthétisé suivant la méthode indiquée par WIELAND, RATH et BENEND (1941). Deux cents mg d'ergostérol sont mis à bouillir sous reflux pendant 2 heures dans l'anhydride acétique (20 ml). L'acétate d'ergostérol est cristallisé dans l'acétone-méthanol (1 : 1) à -15°C . Les gros cristaux plats d'acétate sont séparés par filtration sous vide et séchés sous azote.

TABLEAU I
RF des stérols mentionnés dans cette étude

	Benzène	Ether éthylique-hexane (1,4)
Ergostérol	0,07	0,1
Lanostérol	0,16	—
Substance B.	0,28	—
Substance A.	0,91	0,80
Squalène	0,96	0,96
Acétate d'ergostérol	0,55	0,78
Palmitate d'ergostérol. . . .	0,91	0,94
Oléate d'ergostérol.	0,91	0,94

Palmitate d'ergostérol.

On a utilisé la méthode employée par KAUFMAN, MAKUS et DEIKE (1961) pour préparer l'ester correspondant du cholestérol. Dans cette technique l'acide *p*-toluène sulfonique sert de catalyseur à l'estérification directe du stérol et de l'acide gras.

Après cristallisation dans l'alcool, l'acétone et l'éther-acétone (2 fois), le palmitate d'ergostérol qui a été obtenu est chromatographiquement pur.

Oléate d'ergostérol.

L'estérification directe analogue à celle utilisée pour le palmitate donne un rendement très faible et ne peut pas servir à une préparation. Nous avons choisi de faire la réaction par l'intermédiaire d'un chlorure d'acide : à 40 g d'acide oléique on ajoute goutte à goutte 31 ml de chlorure de thionyle redistillé. On chauffe 1 heure sous reflux et on élimine par distillation l'excès de chlorure de thionyle qui bout à 67°C . Le résidu noirâtre est additionné de 4 g d'ergostérol dissous dans le benzène et chauffé sous reflux pendant 3 heures. On chasse le benzène sous vide ; on reprend le résidu

dans l'éther et on lave plusieurs fois à la soude 0,5 N pour éliminer l'excès d'acide oléique, puis à l'acide chlorhydrique 0,1 N et à l'eau. On évapore l'éther et on traite le résidu brunâtre par un mélange d'alcool-éther (1.1). Après plusieurs jours à -15°C apparaît un précipité jaune séparé par centrifugation au froid. Les cristaux sont redissous à chaud dans l'acétone et l'on fait recristalliser en ajoutant 1/2 volume d'éthanol ; on porte à -15°C et on sépare les cristaux. La cristallisation est répétée en se maintenant en atmosphère inerte. Le produit obtenu est chromatographiquement pur ; il ne renferme ni ergostérol, ni produit de dégradation.

Entre nos mains cette technique a donné de meilleurs résultats que celle décrite par KAUFMAN, MAKUS et DEIKE (1961) dans laquelle on prépare le chlorure de l'acide oléique avec le chlorure d'oxalyle.

C. Chromatographie en couche mince et densitométrie

Le gel de silice G (Merck) est étalé sur des plaques de 200×200 en couches de 0,25 mm d'épaisseur. Les plaques sont séchées lentement et peuvent être conservées quelques jours dans un dessiccateur contenant un gel de silice. Immédiatement avant d'être utilisées, elles sont activées par un chauffage de 1 heure à 105°C .

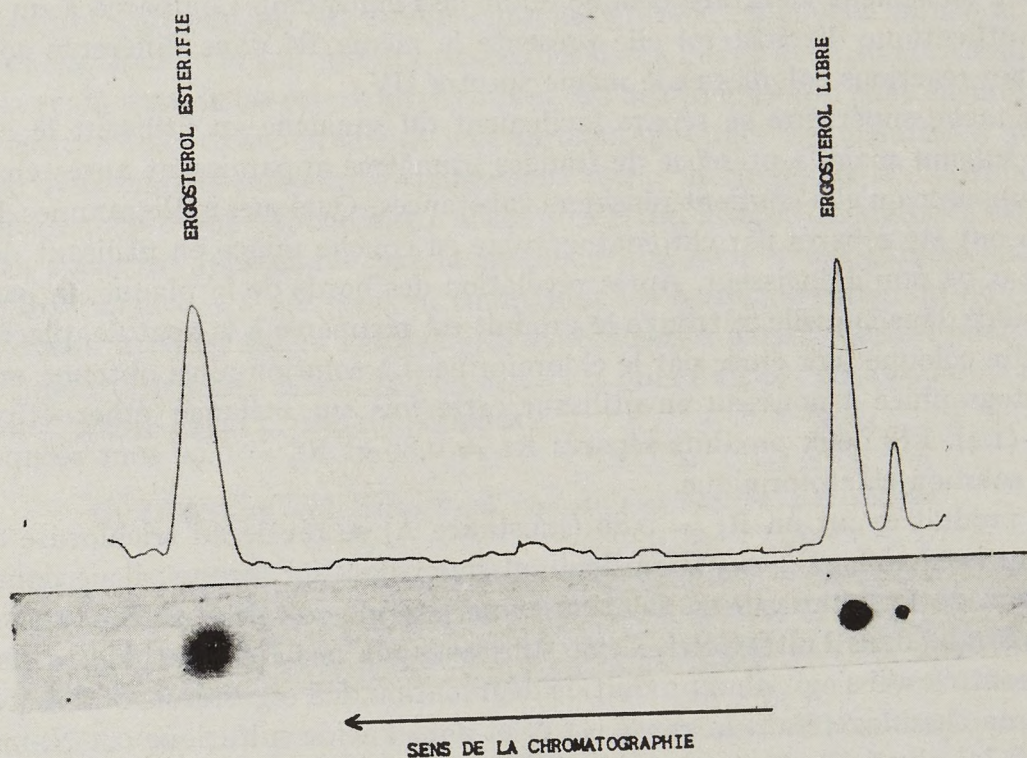


FIG. 1. — Analyse au densitomètre d'un chromatogramme

Dans les essais quantitatifs les produits en solution chloroformique sont déposés en utilisant une seringue distributrice à répétition Hamilton. Deux solvants ont été utilisés dans ces essais, le benzène et le mélange hexane-éther éthylique (4.1). La révélation est obtenue par pulvérisation d'une solution chloroformique de trichlorure d'antimoine à 25 p. 100 qui donne à froid une coloration bleue avec l'ergostérol et ses esters. Après un chauffage de 5 minutes à 105°C , le lanostérol apparaît en rose et le squalène en brun. Le tableau 1 donne les Rf des substances étudiées au cours de ce travail.

Des copies photographiques de ces chromatogrammes peuvent être obtenues avec un appareil à photocopier, en utilisant un papier Retroflex « Kodak ». Ce papier est rendu inversible pour un éclairage dont la longueur d'onde est supérieure à $4500 \text{ \AA}$, aussi un écran jaune-vert a-t-il été interposé entre la source lumineuse et l'émulsion. Le développement et le fixage sont effectués suivant les indications du fabricant dans une machine automatique (Révélateur « Kodak » PR 7 et Stabilisateur « Kodak » PS 21). Pour assurer une bonne conservation des clichés il est indispensable de les laver à l'eau.

L'évaluation des taches est effectuée avec un densitomètre, type *chromograph* (Joyce et Loeb Ltd). Pour cela le positif photographique est découpé en bandes de 20 mm de large, de telle manière que les taches occupent le milieu de la bande. L'appareil donne un enregistrement constitué par une succession de pics dont les surfaces sont ensuite planimétrées. On en verra un exemple sur la figure 1.

RÉSULTATS

A. Identification des esters de l'ergostérol présents dans la levure

Les extraits lipidiques totaux de la levure contiennent deux composés aisément séparables par chromatographie en couche mince. Leur importance relative varie suivant l'échantillon et suivant les conditions d'extraction utilisées. Les deux taches se révèlent à froid avec le trichlorure d'antimoine en donnant une coloration bleue immédiate, caractéristique des stérols. La substance qui se déplace le moins a pu être facilement identifiée comme étant de l'ergostérol. Comparée à un échantillon authentique d'ergostérol elle présente le même Rf dans différents solvants, les mêmes réactions colorées et le même spectre UV.

La tache supérieure se sépare facilement du squalène en utilisant le benzène comme solvant mais la présence de franges brunâtres apparaissant après chauffage laisse supposer qu'elle contient plusieurs substances. Quelques milligrammes de cette fraction ont été séparés par chromatographie en couche mince en utilisant des plaques de 0,75 mm d'épaisseur. Après révélation des bords de la plaque, la bande de gel de silice dans laquelle se trouve le produit est récupérée à la spatule, placée dans une petite colonne puis éluée par le chloroforme. La solution ainsi obtenue est alors chromatographiée à nouveau en utilisant cette fois un mélange éther éthylique-hexane (1.4). Les deux produits séparés $R_f = 0,80$ et $R_f = 0,96$ sont récupérés et mis en solution chloroformique.

Le produit ayant un $R_f = 0,80$ (substance A) se révèle au trichlorure d'antimoine après chauffage à 105°C en donnant une coloration brune ; il ne donne pas la réaction de LIEBERMANN en solution et ne possède pas de spectre d'absorption caractéristique dans l'ultraviolet. Cette substance n'a pas été identifiée, mais nous avons montré qu'il s'agit d'un produit de dégradation de l'ergostérol. On l'a observée lors de son chauffage, dans la soude 0,1 N et dans l'acide sulfurique 0,1 N, mais les quantités les plus importantes ont été obtenues en chauffant à l'autoclave une solution aqueuse d'ergostérol.

La tache ayant un $R_f = 0,96$ est formée par divers esters de l'ergostérol. Elle se révèle par le trichlorure d'antimoine à froid dans les mêmes conditions que l'ergostérol en donnant une coloration bleue. Elle donne la réaction de LIEBERMANN et possède dans le chloroforme un spectre représentant des maxima à 295,3, 273,9 et 267,5 μ , identiques à ceux de l'ergostérol.

Lorsque les substances présentes dans cette tache sont hydrolysées en milieu alcalin, elles produisent un seul stérol, l'ergostérol, qui a été identifié par chromatographie. On a vérifié que les composés présents dans la tache des esters ne sont pas précipités lors d'un traitement de la fraction insaponifiable des levures par la digitonine alors que l'ergostérol libre est précipité. Toutes ces propriétés permettent d'affirmer qu'il s'agit bien des divers esters de l'ergostérol qui n'ont pu être séparés par cette technique chromatographique.

On a synthétisé trois esters de l'ergostérol : acétate, palmitate et oléate pour les comparer à ceux qui ont été extraits des levures. Il est apparu nettement que les esters de l'ergostérol, même l'acétate, sont très difficilement hydrolysables. Un traitement de 1 heure à 120°C dans la soude à 5 p. 100 ne suffit pas à produire une hydrolyse complète. Ceci explique donc que l'on retrouve des esters dans la fraction insaponifiable malgré le traitement alcalin des levures. Les Rf du palmitate et de l'oléate d'ergostérol correspondent bien à celui de la tache que nous avons trouvée dans les extraits de levures. Le spectre de ces esters a les mêmes maxima que celui de l'ergostérol. Ils donnent les mêmes réactions colorées que l'ergostérol, se révélant de la même façon avec le trichlorure d'antimoine et produisant dans la réaction de LIEBERMANN une coloration proportionnelle à la quantité d'ergostérol présent dans l'ester.

La nature des esters d'ergostérol trouvés dans la levure a été précisée par l'analyse des acides gras en utilisant la chromatographie en phase gazeuse. Les esters de l'ergostérol sont purifiés par double chromatographie en couche mince et repris dans le chloroforme. On fait une transestérification à chaud avec du méthanol chlorhydrique et on extrait les esters méthyliques des acides gras qui sont ensuite repris dans le sulfure de carbone en vue de leur chromatographie. Le mélange a pu être résolu en deux composants correspondant aux esters méthyliques de l'acide oléique et de l'acide palmitique. Aucun autre acide gras estérifié avec les stérols n'a pu être décelé en quantité appréciable par la méthode que nous avons utilisée. L'identification des ces acides a été faite en comparant les temps de rétention de l'échantillon inconnu avec les esters méthyliques synthétisés à partir d'acides purs. L'évaluation quantitative des esters de l'ergostérol a donné dans l'échantillon considéré 54 p. 100 d'oléate et 46 p. 100 de palmitate.

B) *Digestion des cellules en vue de l'extraction des stérols*

Un traitement préalable à l'extraction des stérols est indispensable pour deux raisons : il dégrade la paroi et permet au solvant d'extraction de pénétrer jusqu'à l'intérieur de la cellule. Nous avons vérifié que les lipides extraits des cellules de levures par la méthode de KAHANE et ROUS (1961) (alcool, benzène à l'ébullition) ne contiennent que très peu de stérols. Ceux-ci deviennent extractibles lorsque les cellules délipidées ont été traitées à chaud par des lessives alcalines.

On admettait implicitement jusqu'ici, que le traitement alcalin était suffisant pour hydrolyser les esters de l'ergostérol dont la présence dans la levure est connue depuis longtemps. Les résultats que nous avons rapportés montrent qu'il n'en est rien : les esters résistent très bien à l'hydrolyse et les quantités que nous avons retrouvées à la chromatographie laissent présumer qu'une très forte proportion de l'ergostérol se trouve dans les cellules sous forme estérifiée. En outre, lorsqu'on soumet les cellules à des conditions de digestion plus sévères, la saponification de ces esters est plus complète, mais apparaissent alors des produits de dégradation de l'ergostérol. On a donc été amené à préciser les deux points suivants :

— quelles sont les meilleures conditions de digestion des cellules pour obtenir le maximum d'extraction de l'ergostérol ?

— dans quelles conditions peut-on obtenir un extrait reflétant la teneur des cellules en ergostérol libre et estérifié ?

1° *Quantité de levure mise en œuvre.*

Lorsqu'on fait la digestion dans la soude à 15 p. 100, la quantité de levures introduite par ml de solution agit sur le rendement de l'extraction. On a trouvé que les meilleurs résultats sont obtenus avec des quantités de 4 mg de cellules par ml. Dans ces conditions, les extraits ne contiennent généralement plus d'esters de l'ergostérol. Cependant lorsque les cellules renferment beaucoup d'esters ce traitement est encore insuffisant pour provoquer leur hydrolyse complète. Lorsqu'on double la concentration en levures, les esters ne disparaissent jamais entièrement dans les extraits.

Si on hydrolyse dans les mêmes conditions que les levures une solution d'acétate d'ergostérol, on constate que l'hydrolyse est d'autant plus complète que l'acétate se trouve en solution plus diluée. Cependant même en solution très diluée, 0,1 mg/ml, le traitement de 1 heure à 120°C dans NaOH 5 p. 100 n'est pas suffisant pour produire une hydrolyse totale.

2° *Temps de digestion.*

On a examiné l'influence de la durée du traitement sur l'extraction et la saponification des esters de l'ergostérol. Pour cela on a déterminé après des temps de chauffage différents la quantité respective d'ergostérol et de ses esters qui se retrouvent dans les extraits. Les résultats reproduits dans le tableau 2 montrent que 4 heures

TABLEAU 2

Extraction de l'ergostérol de la levure au cours du chauffage

Temps de chauffage en minutes	45	60	120	180	240
Ergostérol libre	0,08	0,25	0,45	0,96	1,18
Ergostérol estérifié	0,00	0,25	0,31	0,48	0,64
Ergostérol total en p. 100 du poids sec	0,08	0,50	0,76	1,44	1,82

Levures dans Na OH 5 p. 100 maintenues pendant les temps indiqués à 100°C en ampoules scellées. La partie non saponifiée est reprise quantitativement dans l'éther, amenée à sec et mise en solution dans un volume connu de chloroforme.

à 100°C ne produisent pas une hydrolyse complète des esters et ne suffisent pas pour obtenir l'extraction totale des stérols contenus dans la levure. Les déterminations des 2 formes de l'ergostérol ont été faites en utilisant la méthode chromatographique qui sera décrite à la fin de ce travail.

En utilisant la soude à 5 p. 100 on n'a pratiquement pas d'intérêt à prolonger le temps de chauffage au-delà d'une heure. On constate en effet par l'examen des chromatogrammes que les esters ne diminuent pas lorsque le traitement dure deux heures au lieu d'une heure. Lorsqu'on effectue un dosage colorimétrique par la réaction de LIEBERMANN, l'ergostérol extrait n'augmente pas lorsqu'on prolonge le temps de digestion au-delà d'une heure.

3° Concentration du réactif de digestion.

Avec la soude à 15 p. 100 employée 1 heure à 120°C on retrouve encore dans l'extrait des traces d'esters de l'ergostérol qui disparaissent lorsque le traitement est prolongé pendant 1 heure 30. Mais dans ces conditions la quantité totale de stérols extraits évaluée par dosage colorimétrique diminue à mesure qu'on prolonge le temps de chauffage. Les chromatogrammes obtenus avec ces extraits présentent des taches d'ergostérol de plus en plus faibles alors qu'apparaissent en quantité croissante des produits de dégradation de l'ergostérol qui ne se déplacent pas.

En remplaçant dans le traitement la soude par l'acide sulfurique (SO_4H_2 5 p. 100, 1 heure à 120°C) il ne se produit pas d'hydrolyse des esters dont de très fortes proportions se retrouvent dans l'extrait. C'est ce traitement qui a été appliqué lorsqu'on a voulu extraire les esters de l'ergostérol. Cependant l'acide sulfurique dégrade l'ergostérol et fait apparaître une substance ayant un R_f de 0,28 dans le benzène (substance B) qui se révèle comme l'ergostérol avec le trichlorure d'antimoine. Ce composé ne possède pas le spectre d'absorption de l'ergostérol. Il s'agit bien d'un produit de dégradation de l'ergostérol qui a été retrouvé en moins grande quantité dans le traitement sous pression de solutions aqueuses d'ergostérol.

C. Dosage des stérols dans les extraits de levures

En prenant quelques précautions, il est possible de doser les stérols une fois qu'ils ont été révélés au trichlorure d'antimoine sur les plaques de chromatographie en couche mince. Comme il est difficile de passer le chromatogramme dans le densitographe utilisé on a été obligé d'en faire une réplique photographique sur papier que l'on peut conserver et analyser après l'avoir découpée en bandes (fig. 1).

Les données du densitographe, qui sont basées sur la mesure de la lumière réfléchie par les taches, sont proportionnelles à la quantité de substance contenue dans les taches lorsque les conditions suivantes sont réalisées.

a) Les taches doivent être suffisamment petites pour ne pas déborder la fente qui les explore et qui dans l'appareil utilisé est de 11 mm.

b) La photographie doit être assez peu contrastée pour éviter que les taches donnent, quelle que soit l'intensité de leur coloration sur la plaque chromatographique, un noir saturé. On y parvient en réalisant une surexposition au moment du tirage. Il apparaît alors sur un fond parfaitement blanc des taches dont le gris plus ou moins intense correspond à leur coloration bleue plus ou moins foncée.

La valeur de cette technique a été vérifiée en effectuant des courbes de références avec les substances suivantes : ergostérol, lanostérol, palmitate d'ergostérol, squalène, séparées ou en mélange.

Les droites tracées sur la figure 2 montrent qu'à des quantités de produits comprises entre 4 et 40 γ on peut faire correspondre des valeurs proportionnelles des densitogrammes. Cependant il n'en est pas toujours ainsi et il arrive d'obtenir des droites qui ne passent pas par l'origine : cas de l'ergostérol estérifié dans la figure 2. Ceci arrive lorsqu'on utilise le papier photographique dans des conditions qui ne correspondent plus à la partie rectiligne de sa courbe caractéristique. Dans le cas qui sert d'exemple, le noircissement n'a pas été suffisant sur le papier photographique et

les taches les moins colorées sur le chromatogramme n'apparaissent plus sur la copie photographique.

Des expériences ont été faites en vue de déterminer la reproductibilité de cette technique et la précision des résultats que l'on peut attendre. Le tableau 3 donne les résultats obtenus en répétant plusieurs fois des taches identiques sur le même

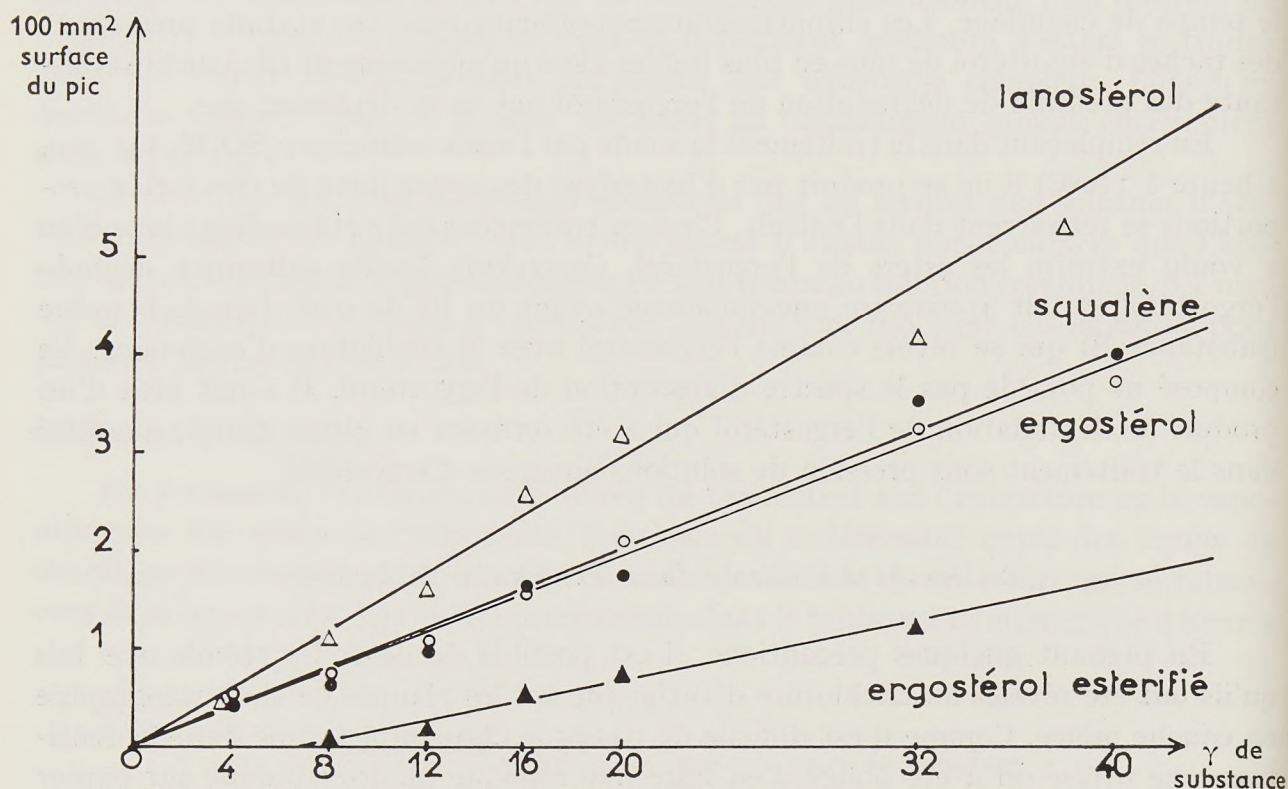


FIG. 2. — Réponses du densitogramme en fonction des quantités de substances pures introduites dans la tache

chromatogramme avec de l'ergostérol, du squalène et du lanostérol. Dans chaque cas, on a étudié la dispersion des résultats qui reste assez faible pour permettre une évaluation quantitative.

TABEAU 3

Variabilité des résultats obtenus avec des quantités identiques de produits purs

N° essai	Surface du pic Ergostérol 20 γ	Surface du pic Squalène 20 γ	Surface du pic Lanostérol 20 γ
1.....	335	223	151
2.....	287	200	146
3.....	316	170	146
4.....	254	170	154
5.....	320		150
6.....	279		139
7.....	300		
μ	297	191	148
	σ = 9,2 %	σ = 13,5 %	σ = 3,5 %

Dans tous les essais précédents, les solutions témoins ont été déposées par goutte de 1 μ l; il a paru utile de déterminer si le fait de déposer la même quantité de substance par fractions plus ou moins importantes, peut changer le résultat des mesures. Le tableau 4 montre que l'on obtient des résultats identiques en plaçant la même quantité d'ergostérol suivant des modalités différentes. On constate qu'en solutions pures la grosseur de la tache de départ n'influe pas sur les mesures à condition de rester dans les limites de diamètre (11 mm) et de concentration (4-40 γ) déjà déterminée.

TABLEAU 4
Influence de la grandeur des taches sur les résultats

Volume déposé	Surface du pic	
5 μ l en 1 fraction	510	$\mu = 510$ $\sigma = 5\%$
5 μ l en 2 fractions	544	
5 μ l en 3 fractions	484	
5 μ l en 6 fractions	503	

Chaque tache contient 20 γ d'ergostérol.

La méthode manque de reproductibilité lorsqu'on passe d'une plaque de chromatographie à l'autre. Il est donc nécessaire d'introduire sur chaque plaque des quantités connues de corps témoins pour leur comparer les valeurs données par la solution inconnue. Les résultats les plus précis seront obtenus lorsque la concentration de la substance à doser sera encadrée par celle des deux taches standard.

On trouvera sur la figure 1 un exemple de chromatogramme et les résultats quantitatifs obtenus pour un échantillon de levure qui ne contenait en quantité appréciable que de l'ergostérol libre et estérifié. On a trouvé une correspondance satisfaisante entre l'ergostérol déterminé par cette méthode et les stérols dosés par la méthode de LIEBERMANN.

Toutefois l'étude que nous avons faite des conditions d'extraction de l'ergostérol montre la difficulté qu'il y a à déterminer l'état libre ou estérifié sous lequel il se trouve dans les cellules. En effet, un traitement acide n'hydrolyse pas les esters mais donne des produits de dégradation. Un traitement alcalin n'extraît qu'une faible partie de l'ergostérol lorsqu'il n'est pas suffisamment poussé. Lorsqu'on les prolonge on hydrolyse alors les esters qui ont été extraits. Les résultats donnés dans le tableau 1 montrent que, dans l'échantillon de levure étudié, les esters de l'ergostérol représentent au moins 35 p. 100 de l'ergostérol trouvé dans les cellules.

DISCUSSION

La chromatographie sur gel de silice en couche mince a permis de déceler dans les levures l'ergostérol et ses esters. Ces composés constituent habituellement la masse des stérols présents dans la levure. Lorsque les cellules sont encore en cours

de croissance, on peut également y trouver de faibles quantités de lanostérol et de squalène qui sont les précurseurs de l'ergostérol. Plusieurs taches qui apparaissent sur le chromatogramme ne sont en réalité que des artefacts produits par des modifications de l'ergostérol et de ses esters au cours de la digestion des cellules ou de leur extraction.

Nous n'avons jamais pu retrouver les stérols mineurs isolés de la levure par WIELAND, RATH et BENEND (1941). Ceci peut provenir de ce que ces substances sont présentes à des concentrations trop faibles pour pouvoir être décelées par cette technique. Pour obtenir quelques mg de néostérol, d'épistérol, d'hypostérol, d'ascostérol et de fécostérol, ces chercheurs devaient en effet, traiter de grandes quantités de résidus de production industrielle d'ergostérol. Il est plus étonnant que nous n'ayons pas décelé par chromatographie des substances comme le zymostérol, le 5-dihydroergostérol et surtout le 24-(28)-déhydroergostérol qui, d'après BREIVIK, OWADES et LIGHT (1954) pourrait représenter jusqu'à 20 p. 100 des stérols totaux de la levure. On est donc en droit de se demander si ces substances existent réellement dans toutes les espèces de levures.

L'ergostérol est en grande partie estérifié avec les acides gras qui se rencontrent dans les lipides de la levure. Les acides palmitique et oléique sont, d'après NEWMAN et ANDERSON (1933), les constituants prédominants des graisses de *Saccharomyces cerevisiae*, d'après notre analyse c'est avec eux qu'est liée la plus grande partie de l'ergostérol.

Reçu pour publication en novembre 1964.

SUMMARY

SEPARATION, IDENTIFICATION AND QUANTITATIVE DETERMINATION OF ERGOSTEROL AND ITS PRECURSORS IN YEAST

A method is described which permits the evaluation of ergosterol and its esters, lanosterol and squalene, in mixtures. The compounds are separated by thin-layer chromatography on silica gel, using benzene as solvent, and revealed with antimony trichloride. The resulting chromatograms are then printed on reversible photographic paper and analysed densitometrically, so that each of the separated products can be determined by comparing it with known quantities of reference substances chromatographed on the same plate.

This method has been applied to yeast. Lanosterol and squalene were found in yeasts which were in the growth phase. Free ergosterol and ergosterol esterified with palmitic and oleic acids were found in all samples. The complete extraction of sterols from yeast is the most difficult part of their quantitative determination.

Direct solvent extraction in the hot yields only an infinitesimal portion of the sterols. Treatment for 1 hour at 120°C in 5 p. 100 NaOH is not sufficient to hydrolyse all ergosterol esters, for which purpose 15 p. 100 NaOH is required. The extremely high resistance of the esters of ergosterol to hydrolysis has been verified on pure substances.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BREIVIK O. N., OWADES J. L., LIGHT R. F., 1954. A new tetraethenoid sterol of yeast. *J. Org. Chem.*, **19**, 1734-1740.
JACOBSON G. M., 1964. Quantitation of Estrone, Estradiol and Estriol on thin layer chromatograms by a photogrammetric procedure. *Anal. Chem.*, **36**, 275-79.

- KAHANE E. et ROUS S., 1961. Nouvelle méthode d'extraction des lipides. In : *Enzymes of lipid metabolism*, Pergamon Press, 82-90.
- KAUFMANN H. P., MAKUS Z., DEICKE F., 1961. Trennung der cholesterin-Fettsäureester. *Fette Seifen Anstrichmittel*, **63**, 235-38.
- MAUGENET J. et DUPUY P., 1964. Synthèse des stérols par la levure. *Ann. Techn. agric.*, **13**, 329-354.
- NEWMAN M. S. et ANDERSON R. J., 1933. The chemistry of the lipids of yeast. I. The composition of the acetone soluble fat. *J. Biol. Chem.*, **102**, 219-228.
- WIELAND H., RATH F. et BENEND W., 1941. Über die Nebensterine der Hefe. *Annalen*, **548**, 19-34.

LES LEVURES ALCOOLIQUES DANS LES VINS. PROTÉOLYSE, PROTÉOGENÈSE (III) ⁽¹⁾

C. FLANZY et Ch. POUX

Avec la collaboration technique de M. CAILLET

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne, (Aude)

SOMMAIRE

Les auteurs complètent un travail précédent sur l'évolution de l'azote exogène apporté sous forme d'ammonium, à des doses telles qu'il n'en reste plus dans le produit fermenté. De plus, ce travail permet de contrôler certains résultats précédemment énoncés.

I. — INTRODUCTION

Au cours d'une étude précédente (C. FLANZY, Ch. POUX, M. FLANZY, 1964) nous avons mentionné l'importance de l'aminogenèse induite par les ions NH_4 ajoutés au milieu de fermentation.

Les doses d'azote ajoutées avaient été choisies anormalement élevées, de telle manière qu'il restait dans le vin après fermentation un excès d'ammonium. De plus, ces doses ajoutées l'avaient été à l'aide de sels d'ammonium différents, à savoir un bitartrate, un phosphate et un sulfate de façon à se rendre compte de l'influence de la nature de l'anion introduit.

Dans ce travail nous envisageons l'étude de ce pouvoir aminogène d'une part, avec des doses d'ammonium ajoutées au moût, telles qu'il n'en reste plus ou très peu dans le produit fermenté qui en résulte, d'autre part, nous avons choisi un sel d'ammonium dont l'anion disparaît du milieu par décomposition au cours de la fermentation, en l'occurrence le carbonate d'ammonium. De plus, ce travail doit permettre de contrôler certains résultats signalés les années précédentes.

II. — EXPÉRIENCES ET TECHNIQUES

Moût : Terret-Bourret de la récolte 1963, identique à celui utilisé pour les travaux précédents, provenant de la même parcelle, contenant par litre :

Matières réductrices en glucose (g)	177
Azote total (mg)	140
Azote ammoniacal (mg)	8,4

⁽¹⁾ Les première et deuxième parties de cette étude sont parues dans les Annales de Technologie agricole, 1964, 13, 1 et 3.

Ce moût a été enrichi de doses croissantes d'azote, sous forme de carbonate d'ammonium (Prolabo). Ces additions correspondent en azote par litre respectivement à :

198,6 mg	non aéré	essai n° 1
	aéré	essai n° 4
274,6 mg	non aéré	essai n° 2
383,6 mg	non aéré	essai n° 3

Tous ces essais ont été ensemencés immédiatement dès la mise en bocal, avec la même culture de *Saccharomyces ellipsoïdeus* à raison de 1.10^6 /ml.

Ils ont été mis en chambre conditionnée à la température de 25°C. La fermentation était terminée au bout de 10 jours.

III. — RÉSULTATS

A. Influence des sels ammoniacaux sur la vitesse de fermentation et la population des levures

Nous retrouvons l'effet stimulant des additions ammoniacales sur la vitesse de fermentation tel que cela est représenté dans la figure 1.

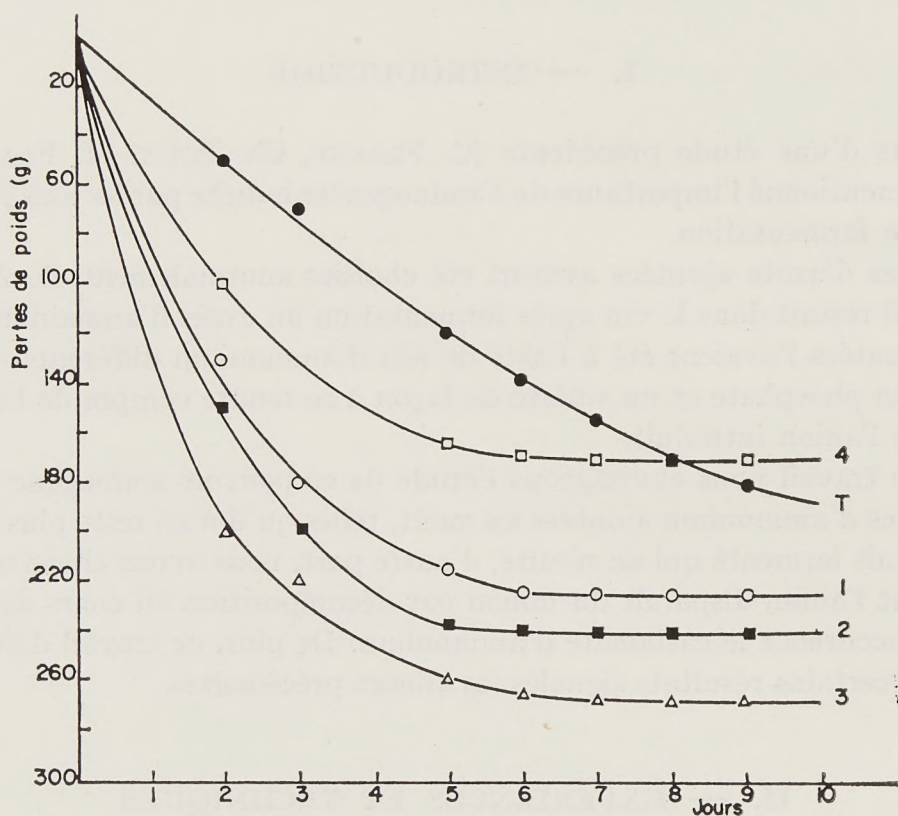


FIG. 1. — Courbes de fermentation

En ce qui concerne la multiplication cellulaire, elle se révèle beaucoup plus importante que dans les expériences de l'année précédente ; elle se stabilise autour de $250 \cdot 10^6$ ml à partir de 274,6 mg d'azote ajouté. L'aération est nettement favorable à l'accroissement du nombre des levures, les résultats des numérations sont rassemblés dans le tableau n° 1.

Morphologie des levures.

La population du témoin et des essais est essentiellement composée de levures elliptiques; seul l'essai aéré présente quelques levures apiculées. En 1962 nous avons noté une proportion plus élevée de levures apiculées dans les vins enrichis en ammonium et l'on avait émis l'hypothèse que l'ammonium ou l'acidité pouvaient favoriser le développement des levures apiculées, aussi dans cet essai de 1963 notre attention a été portée sur cette observation.

TABLEAU I

Population de levures en fonction de l'ammonium ajouté

Essais	Témoin	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4 (aéré)
Doses d'azote ajoutées en mg/l	0	198,6	274,6	383,6	198,6
Levures 10 ⁶ /ml	110	198	252	249	237
Accroissement p. 100 par rapport au témoin		80	129	126	115

Il ne nous a pas été donné l'occasion d'observer à nouveau ce phénomène. C'est seulement dans l'essai aéré que l'on a pu observer quelques levures apiculées en très faible proportion.

*B. Influence des sels ammoniacaux
sur certains caractères analytiques des vins*

1° Analyse sommaire.

Dans le tableau n° 2 sont groupés les résultats d'une analyse faite au moment de la dégustation (1 an après).

TABLEAU 2

Analyse sommaire des vins

Essais	Acidité en meq/L		pH	Alcool p. 100 en volume	Sucre g./l. (en glucose)
	Totale	Volatile			
Moût	115,00		3,16		177,0
Témoin	87,00	6,8	3,40	10°40	1,03
N° 1	83,00	6,2	3,45	10°20	0,53
N° 2	78,00	5,2	3,45	10°20	0,62
N° 3	81,00	6,4	3,50	10°30	0,83
N° 4 (aéré).....	83,00	5,2	3,40	10°10	0,51

La fermentation malo-lactique était effectuée dans tous les échantillons

2° Les différents constituants azotés.

Dans le tableau n° 3 sont présentés les résultats donnés par les différentes analyses des constituants azotés du moût et des vins. Les méthodes utilisées ont été indiquées lors des travaux précédents. Nous y avons ajouté le dosage de l'azote total effectué sur le précipité des protéines obtenu à — 10°C par addition de 4 volumes d'acétone.

TABLEAU 3
Différentes formes de l'azote contenus dans les vins
(mg par litre)

Essais	Azote Total	Azote amoniacal	Azote organique	Azote des acides aminés (2)	Azote Protéique	Azote organique non déterminé
Moût	140	8,4	131,6	84,9	47,0	0
Témoin	43,5	0	43,5	5,5	17,3	20,7
N° 1 (338,6) (1)	103	1,1	101,9	35,8	32,4	33,7
N° 2 (414,6) . . .	125	4,7	120,3	46,4	39,4	34,5
N° 3 (521,6) . . .	135,6	5	130,6	56,5	38,4	35,7
N° 4 aéré (338,6)	75,9	1,6	74,3	21,8	23	29,5

(1) Teneur initiale en azote total du moût avant fermentation.
(2) Dosé par microbiologie.

Dans une deuxième série d'analyses on a exclusivement déterminé les acides aminés par voie microbiologique.

Les résultats sont rassemblés dans le tableau 4.

Comme dans les travaux précédents, le taux d'arginine a fortement diminué pendant la fermentation, cependant, par rapport au témoin l'enrichissement des vins en acides aminés est toujours aussi net lorsqu'ils sont enrichis en ammonium.

Remarquons, dans l'expérience de cette année (1963), que nous n'atteignons pas les teneurs élevées en acides aminés observées en 1962. Le témoin en est particulièrement pauvre (43,5 mg d'azote total et 5,5 mg d'azote provenant des acides aminés).

3° Dégustation des vins.

Couleur : jaune clair des 5 échantillons. Cependant le n° 3 est plus foncé, puis le n° 1. Les autres échantillons sont semblables.

Odeur : très fine pour le n° 3, mais en revanche présente quelque chose de légèrement désagréable.

Dégustation proprement dite : le n° 3 est nettement plus fin, plus bouqueté et le mieux équilibré. Il se distingue de tous les autres d'une manière très caractéris

tique. Le n° 1 se rapproche du n° 3 par sa finesse et son équilibre, mais présente un léger goût qui disparaît au bout d'un certain temps à l'air. Le n° 2, plus plat, a un goût très légèrement désagréable faisant penser à une trace de mercaptan. Le n° 4 et le témoin sont très nettement moins bien équilibrés, le n° 4 donnant la sensation la plus acide.

TABLEAU 4

Composition en acides aminés des vins de Terret-Bourret
(En micromolécule par litre — dosage microbiologique)

Essais	Moût	Témoin	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4
Alanine	432,0	0	159,30	210,9	331,0	145,9
Arginine	688,8	5,7	27,5	35,5	40,1	13,7
Acide aspartique	134,0	0	99,9	149,5	175,7	37,5
Acide glutamique	536,9	36,7	224,0	258,0	271,8	112,8
Cystine	0	0,4	2,4	2,0	3,7	2,9
Glycocolle	66,0	39,9	261,0	290,3	327,6	166,5
Histidine	42,0	10,9	46,0	55,0	65,0	28,0
Isoleucine	110,0	7,2	111,3	137,2	161,6	69,3
Leucine	160,0	21,3	179,9	205,8	256,9	109,7
Lysine	22,0	5,4	103,2	136,8	186,7	50,6
Méthionine	24,1	15,4	25,4	38,8	45,5	17,4
Phénylalanine	202,0	0	113,8	117,4	122,2	48,4
Proline	489,0	0	81,6	321,3	408	55,5
Sérine	570,0	197,9	494,7	513,7	627,0	352,0
Thréonine	159,5	7,0	137,6	156,9	224,8	74,7
Tyrosine	25,9	0	38,6	77,8	89,4	33,1
Tryptophane	32,0	1,6	10,4	16,1	16,6	5,3
Valine	162,0	5,9	157,9	194,6	240,7	83,6
Total des acides aminés (μ mole)	3 856,2	355,3	2 274,5	2 917,6	3 594,3	1 346,9
Total des acides : (Exprimé en mg d'azote par litre)	84,93	5,56	35,86	46,42	56,55	21,85

En conclusion on a le classement suivant : n° 3, 1, 2 et *ex aequo* témoin et n° 4. Le n° 3 se différencie nettement par son odeur et son goût agréable et se classe en tête.

IV. — DISCUSSION

A. *Composition analytique des vins*

Les variations d'acidité sont très faibles, le sel ajouté disparaissant totalement du milieu au fur et à mesure de son utilisation.

Les différences dans la teneur alcoolique des divers essais sont relativement faibles, il semble cependant que le rendement des levures en alcool se trouve très légèrement affaibli ainsi que le montrent les résultats du tableau 2.

L'essai n° 4 aéré est celui qui a le degré alcoolique le plus faible et le rapport sucre-alcool le plus élevé, montrant ainsi l'effet bien connu de l'aération sur le rendement de la fermentation alcoolique.

B. *Évolution des différentes formes d'azote*a) *Le phénomène global.*

Lors de la transformation du moût en vin, on observe toujours une diminution de l'azote total et surtout de l'azote ammoniacal.

Le tableau 5 donne les variations des quantités d'azote consommées en fonctions des quantités d'azote ammoniacal ajoutées dans les essais nos 1, 2, 3 et 4.

TABLEAU 5

Consommation de N sous différentes formes au cours de la fermentation
(N en mg./l.)

	Témoin	1	2	3	4	
N Total	96,5	235,6	289,6	388,0	262,7	+
N ammoniacal	8,4	205,9	278,3	387,0	205,4	=
N organique	88,1	29,7	11,3	1,0	57,3	+
N animé (microbiologique)	79,4	49,1	38,5	28,4	63,1	+

Lorsque l'azote ammoniacal ajouté croît, l'azote ammoniacal consommé croît aussi de la même quantité (la quantité consommée est dans ces essais presque toujours égale à la quantité ajoutée). En même temps, on voit que tout se passe comme si l'azote organique était économisé au fur et à mesure que la teneur en ammonium du milieu augmente. Cette économie de l'azote organique se traduit par une consommation en acides aminés d'autant plus faible que la teneur en azote ammoniacal est élevée, et par conséquent consommée.

De ce phénomène global on peut déduire que l'azote ammoniacal est une forme facilement et rapidement assimilable par la levure. Cependant, le phénomène est moins simple, car comme il a été suggéré antérieurement (WEISS, 1959), (C. FLANZY, Ch. POUX, M. FLANZY, 1964), la levure consomme les différents acides aminés avec plus ou moins d'intensité au cours de la fermentation et restitue en même temps au milieu, soit ces mêmes acides aminés provenant de ses propres protéines, soit d'autres nouvellement synthétisés. Cela avec des intensités plus ou moins élevées selon la quantité d'ammonium ajoutée, de telle sorte que l'on a plutôt affaire à un remaniement des différentes formes de l'azote organique qu'à une économie proprement dite. Cette économie n'est donc en réalité que l'aspect global du phénomène au niveau de l'azote organique total.

Les essais n^{os} 1 et 4 rendent compte dans un essai enrichi en ammonium de l'influence de l'aération. Celle-ci provoque une augmentation de la consommation de l'azote organique et, en particulier, de l'azote aminé. Ceci se comprend par le fait qu'il y a une plus grande multiplication de levures et que pratiquement l'azote ammoniacal est consommé dans le deuxième cas. Le besoin plus élevé en azote provoqué par l'aération qui favorise la multiplication des levures est fourni ici par la seule source d'azote restante, à savoir l'azote organique.

Dans le tableau 3 nous avons calculé la différence entre la teneur en azote organique et la somme des valeurs de l'azote des acides aminés dosés par la méthode biologique et des protéines isolées par précipitation acétonique.

Il y aurait très peu de formes de cet azote indéterminé dans le moût alors qu'après fermentation ces formes se révèlent très importantes. Dans le vin témoin 50 p.100 environ de l'azote organique est constitué par cet azote indéterminé. Dans les vins issus de moûts enrichis en ammonium, il semble que cette forme d'azote est sensiblement constante environ 30 p. 100 de l'azote organique restant dans le vin (tabl. 3). On constate aussi qu'à une addition d'ammonium de plus en plus élevée la levure répond par une restitution au milieu fermenté d'une quantité d'acides aminés de plus en plus élevée.

On peut penser que cet azote organique non déterminé peut englober beaucoup de formes, au nombre desquelles : des acides aminés non dosés par nos méthodes, des polypeptides et amides, des protéines non précipitées et des acides nucléiques ou des nucléotides.

b) *Évolution des acides aminés pris individuellement.*

Ce phénomène de redistribution de l'azote au cours de la fermentation est d'ailleurs illustré par la marche de l'évolution de certains acides aminés pris individuellement. Dans les essais de 1963 on voit (Fig. 2) que l'on peut classer les acides aminés dosés en trois groupes par rapport à l'action de l'ammonium.

— Ceux qui sont consommés dans le témoin voient, par l'apport de l'ammonium, leur teneur :

1^o Augmenter faiblement. Ce sont l'arginine, la phénylalanine, l'a. glutamique.

2^o Remonter à une valeur voisine (en plus ou en moins) de la valeur initiale qui existait dans le moût avant fermentation. Ce sont, la proline et la sérine.

3^o Dépassez la teneur initiale du moût. Ce dernier groupe montrant l'existence de ce remaniement des acides aminés au cours de la fermentation est le groupe le plus nombreux et comprend tous les autres acides aminés dosés.

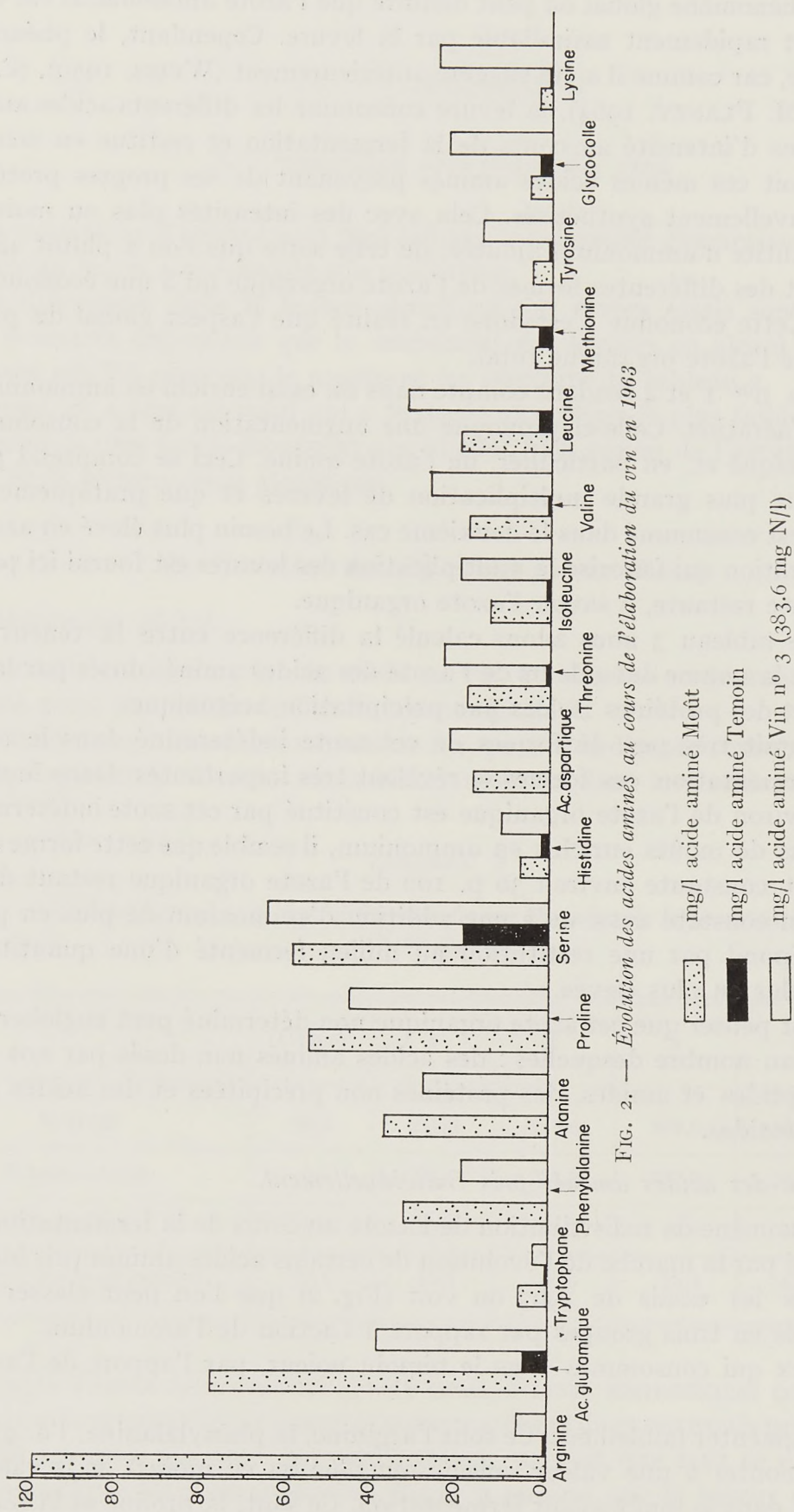


FIG. 2. — Évolution des acides aminés au cours de l'élaboration du vin en 1963

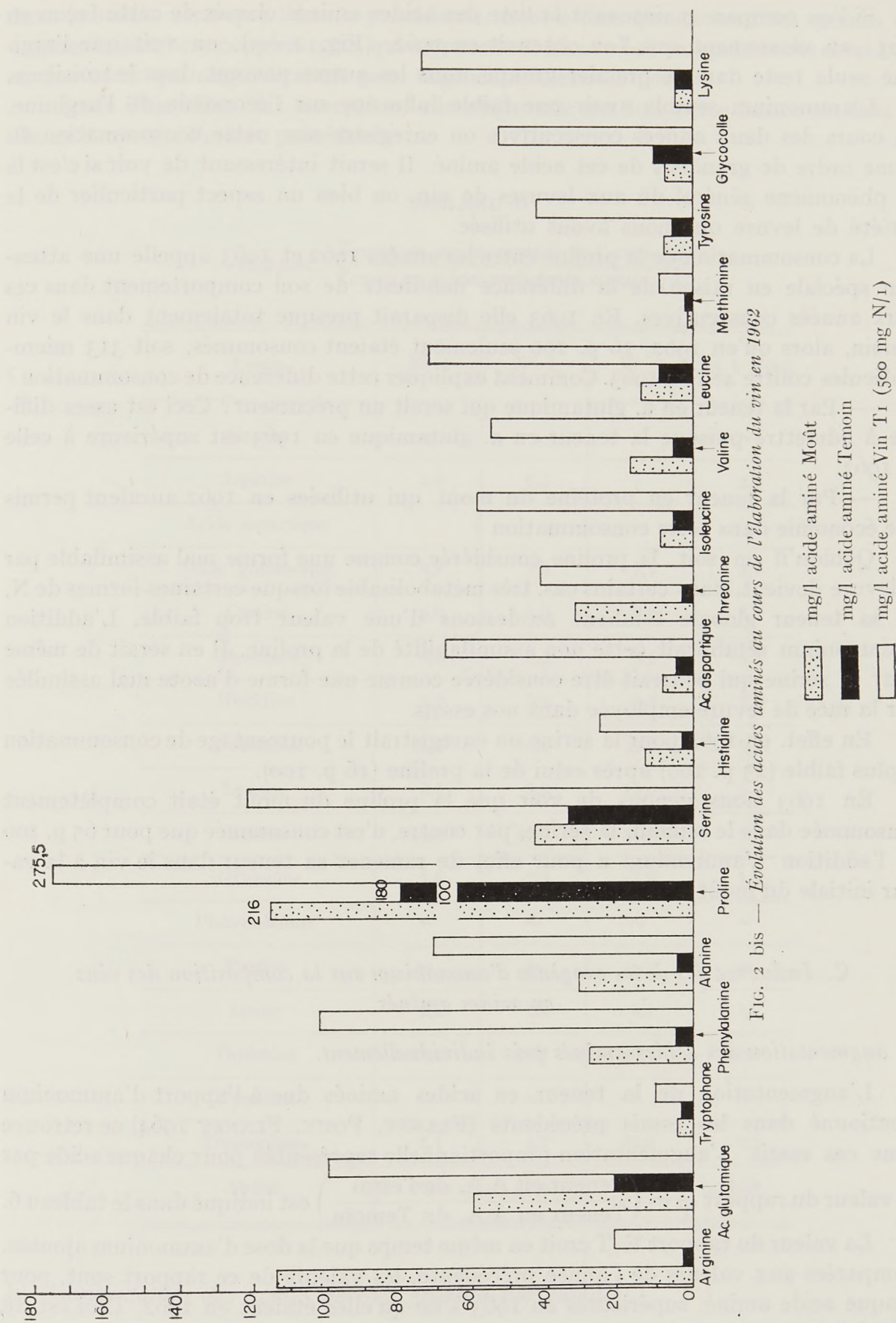


FIG. 2 bis — Évolution des acides aminés au cours de l'élaboration du vin en 1962

Si l'on compare maintenant la liste des acides aminés classés de cette façon en 1963, au classement que l'on obtenait en 1962, (Fig. 2 bis), on voit que l'arginine seule reste dans le premier groupe, tous les autres passant dans le troisième.

L'ammonium semble avoir une faible influence sur l'économie de l'arginine. Au cours des deux années consécutives on enregistre une nette consommation du même ordre de grandeur de cet acide aminé. Il serait intéressant de voir si c'est là un phénomène général dû aux levures de vin, ou bien un aspect particulier de la variété de levure que nous avons utilisée.

La consommation de la proline entre les années 1962 et 1963 appelle une attention spéciale en raison de la différence manifeste de son comportement dans ces deux années consécutives. En 1963 elle disparaît presque totalement dans le vin témoin, alors qu'en 1962, 16 p. 100 seulement étaient consommés, soit 313 micro-molécules contre 489 en 1963. Comment expliquer cette différence de consommation ?

— Par la teneur en a. glutamique qui serait un précurseur ? Ceci est assez difficile à admettre puisque la teneur en a. glutamique en 1963 est supérieure à celle de 1962.

— Par la teneur en protéine du moût qui utilisées en 1962 auraient permis une économie dans cette consommation ?

Quoiqu'il en soit, la proline considérée comme une forme mal assimilable par la levure devient, dans certains cas, très métabolisable lorsque certaines formes de N, ou sa teneur globale tombent au-dessous d'une valeur trop faible. L'addition d'ammonium rétablirait cette non assimilabilité de la proline. Il en serait de même pour la sérine qui pourrait être considérée comme une forme d'azote mal assimilée par la race de levure employée dans nos essais.

En effet, en 1962 pour la sérine on enregistrait le pourcentage de consommation le plus faible (23 p. 100) après celui de la proline (16 p. 100).

En 1963 nous venons de voir que la proline du moût était complètement consommée dans le témoin, la sérine, par contre, n'est consommée que pour 65 p. 100 et l'addition d'ammonium a pour effet de ramener sa teneur dans le vin à la valeur initiale du moût.

C. Influence des doses exogènes d'ammonium sur la composition des vins en acides aminés

a) augmentation des acides aminés pris individuellement.

L'augmentation de la teneur en acides aminés due à l'apport d'ammonium mentionné dans les essais précédents (FLANZY, POUX, FLANZY 1964) se retrouve dans ces essais. L'augmentation proportionnelle représentée pour chaque acide par la valeur du rapport $\frac{E}{T} = \left(\frac{\text{Teneur en A.A. de l'essai}}{\text{Teneur en A.A. du Témoin}} \right)$ est indiqué dans le tableau 6.

La valeur du rapport E/T croît en même temps que la dose d'ammonium ajoutée. Comparées aux valeurs de l'année précédente, les valeurs de ce rapport sont, pour chaque acide aminé, supérieures en 1963 à ce qu'elles étaient en 1962. Ceci est dû à la faible teneur en différents acides aminés du vin témoin. Certains d'entre eux avaient une valeur si faible qu'ils étaient indosables par la méthode utilisée.

L'augmentation de ce rapport varie pour chaque acide aminé sensiblement

dans le même sens que l'année précédente, c'est-à-dire que ce sont les mêmes qui augmentaient beaucoup en 1962, qui augmentent encore beaucoup dans cet essai 1963 et que ceux qui augmentaient peu, augmentent encore peu.

Seule l'histidine fait exception, elle augmente six fois cette année au lieu de dix en moyenne l'année précédente.

TABLEAU 6

$$\text{Rapport : } \frac{\text{Teneur en acides aminés de l'essai (E)}}{\text{Teneur en acides aminés du témoin (T)}}$$

Essais	N° 1	N° 2	N° 3	N° 4 (aéré)
Alanine	~	~	~	~
Arginine	4,8	6,2	7	2,4
Acide aspartique				
Acide glutamique	6,1	7,0	7,4	3,0
Cystine	6,0	5,0	9,0	7,0
Glycocolle	6,5	7,2	8,2	4,1
Histidine	4,2	5,9	6,0	2,5
Isoleucine	15,3	18,0	22,3	9,5
Leucine	8,4	9,6	12,0	5,1
Lysine	18,8	25,0	34,0	9,2
Méthionine	1,6	2,5	2,9	1,1
Phénylalanine	~	~	~	~
Proline	~	~	~	~
Sérine	2,5	2,6	3,1	1,7
Thréonine	23,4	26,7	35,8	12,7
Tyrosine	~	~	~	~
Tryptophane	6,1	9,7	10,0	3,2
Valine	26,4	32,4	40,2	14,0

b) *Augmentation des acides aminés groupés par famille.*

Comme dans les travaux précédents, il est commode de grouper les acides aminés par famille, comme l'a proposé HARRIS (1958). Une idée de la protéogenèse induite par l'ammonium peut être matérialisée par la différence donnée entre les valeurs

d'un essai enrichi et le vin témoin non enrichi, soit ici : 1 — T ; 2 — T ; 3 — T ; 4 — T. La comparaison des essais 1 — T et 4 — T montre en plus l'influence de l'aération.

Le pourcentage d'augmentation de chaque famille d'acides par rapport à l'augmentation globale de l'essai est donné dans le tableau 7.

TABLeAU 7

*Pourcentage d'augmentation de chaque famille d'acides
par rapport à l'augmentation globale de l'essai*
(Les calculs ont été effectués sur les teneurs en acides aminés
exprimés en micromolécules)

	Protéogénèse due à NH ₄			
	Sans aération			Avec aération
	1 — T	2 — T	3 — T	4 (aéré) — T
F. Glutamique	15,10	22,30	20,90	13,20
F. Aspartique	17,90	17,60	17,80	16,00
F. Alanine	24,40	22,80	24,70	29,60
F. Sérine	27,00	22,10	22,20	26,90
F. Aromatiques	8,30	8,10	6,90	8,10
F. Histidine	1,80	1,70	1,60	1,60
F. Lysine	5,00	5,10	5,50	4,30

La part la plus importante de l'augmentation est constituée par les acides aminés des familles de l'alanine et de l'acide glutamique comme dans les essais précédents (1962). Cette année viennent s'ajouter les acides aminés de la famille de la sérine avec 22 p. 100 pour l'essai 3 — T. Cette élévation du pourcentage des acides aminés du groupe de la sérine sous l'action de l'ammonium est surtout due à l'accroissement du taux de sérine, 13,2 p. 100 au lieu de 8,9 alors que celui du glyocolle reste à peu près constant avec 8,9 contre 8,4 p. 100. Comment expliquer ce phénomène ? Si l'on considère la contribution de chaque famille à l'augmentation totale et si celle-ci peut- être considérée comme donnant en gros la mesure de la synthèse des différents acides aminés induite par l'ammonium, on voit que les pourcentages d'augmentation de chaque famille sont très voisins d'une année à l'autre, ce qui permet de penser que l'on aurait à faire aux mêmes mécanismes généraux de synthèse ; cependant la différence donnée par la sérine reste inexpliquée ; ceci en raison même du manque d'informations des différentes voies de synthèse que nous avons sur cet acide (HARRIS, 1958). Toutefois, nous observons que l'augmentation des acides aminés de la famille de la sérine est concomitante de l'augmentation des acides aminés de la famille de

l'alanine, lorsqu'on est dans le cas d'anaérobiose d'une fermentation normale ; au contraire, l'aérobiose (cas des essais aérés) qui a pour résultat d'élever les pourcentages d'acides aminés de la famille de l'alanine, diminue ou laisse constants ceux de la famille de la sérine. On serait donc amené à penser que les acides aminés de la famille de la sérine ont servi à la constitution des levures qui se sont développées dans le milieu puis ont été enlevées avec les lies, ou bien qu'une des voies de synthèse possible de la sérine à savoir, l'amination de l'acide hydroxypyruvique dérivant lui-même de l'acide glycérique formé en cours de fermentation, est influencée par l'aération. Cette dernière hypothèse apparaît comme vraisemblable.

CONCLUSION

Ces essais confirment, dans leur ensemble, les conclusions du travail précédent (C. FLANZY, Ch. POUX, M. FLANZY, 1964), à savoir que :

— l'apport exogène d'ammonium permet d'enrichir la teneur des vins en acides aminés dans une proportion considérable, en rapport d'ailleurs avec la quantité d'ammonium ajoutée ;

— il existe, de la part de la levure, un phénomène de restitution au vin par synthèse et excrétion d'acides aminés des différentes familles ;

— Le mécanisme général de fixation est sensiblement le même dans ces deux séries d'essais (a. glutamique-déshydrogenase-aspartase, et peut-être alanine-déshydrogénase). Seule la plus grande formation de sérine, dans ces derniers essais, peut faire penser à une amination de l'acide hydroxypyruvique ;

— du point de vue technologique, indépendamment de l'apport nutritionnel qui, quoique faible, n'en existe pas moins, l'ammonium a apporté au cours de la fermentation par la formation d'acides aminés et peut-être de leurs produits de transformation qui sont ensuite restés dans le vin fini, une amélioration au point de vue organoleptique.

Rapprochée de l'amélioration que nous avons déjà mentionnée au cours de l'étude du phénomène d'autolyse des levures de vin (CH. POUX, C. FLANZY, M. FLANZY, 1964), il semble bien que la teneur en acides aminés d'un vin doive être prise en considération.

Reçu pour publication en décembre 1964.

SUMMARY

ALCOHOLIC YEASTS IN WINES. PROTEOLYSIS AND PROTEOGENESIS (III)

In an extension of previous work, the present paper deals with the study of aminogenesis induced by ammonium ions added to the fermentation medium, at such a dose that none remains in the fermented product.

A confirmation is given of the fact that the exogenous ammonium considerably increases the amino acid content of wines and that yeast restores the amino acids in the wine by synthesis and excretion.

From the technological point of view, the ammonium took effect in the course of fermentation by the formation of amino acids, and it may be that the improvement from the organoleptic point of view is due to their transformation products which then remain in the finished wine.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- POUX C., FLANZY C., FLANZY M., 1963. Les levures alcooliques dans les vins. Protéolyse et protéogenèse. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 5-18.
- POUX C., FLANZY M., FLANZY M., 1964. Les levures alcooliques dans les vins. Protéolyse et protéogenèse. *Ann. Technol. agric.*, **13**, (3), 283-300.
- HARRIS G., 1958. Nitrogen Metabolism, p. 477, in A. H. COOK. *The Chemistry and Biology of yeasts*, Acad. Press. Inc. Publishers.
- WEISS H., ROUSSET A., BONNET R., 1959. L'évolution des différentes formes d'azote au cours de la fermentation des moûts de raisins provenant de cépages d'Alsace. *C. R. Acad. Sci.*, **249**, 1796.

ÉTUDE D'UN DOSAGE SIMPLE DE L'ACIDE MALIQUE APPLIQUÉ AUX VINS A L'AIDE DE *SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE*

E. PEYNAUD et M^{me} S. LAFON-LAFOURCADE

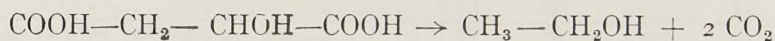
Station agronomique et œnologique, Bordeaux (Gironde)

SOMMAIRE

Certaines souches de *Schizosaccharomyces pombe* ont la propriété remarquable de faire fermenter l'acide *l*-malique en le transformant en alcool et gaz carbonique. En nous basant sur cette observation, il nous a été possible de réaliser un dosage simple de l'acide malique des vins, précis et spécifique, nécessitant peu de manipulations et comportant seulement deux titrages acidimétriques comparés. Ce dosage consiste schématiquement à mesurer la perte d'acidité titrable en un temps donné d'une prise d'essai additionnée d'une suspension de cellules jeunes de *Schizosaccharomyces* (PEYNAUD et S. LAFON-LAFOURCADE, 1964).

PRINCIPE DE LA MÉTHODE

Il a été montré récemment que certaines souches de levures se multipliant par scissiparité, appartenant à l'espèce *Schizosaccharomyces pombe*, provoquent en anaérobiose et à des pH voisins de 3,0, une fermentation alcoolique de l'acide *l*-malique suivant la réaction :



Voir notamment pour une bibliographie complète : MAYER et TEMPERLI (1963), PEYNAUD, S. DOMERCQ, A.-M. BOIDRON, S. LAFON-LAFOURCADE et G. GUIMBERTEAU (1964), PEYNAUD et SUDRAUD (1964).

Lorsqu'une telle levure fait fermenter un moût de raisin, une proportion de 85 à 95 p. 100 de l'acide malique du moût est métabolisée et il s'en suit une désacidification importante.

Nous avons déterminé à l'appareil de Warburg, par mesure du gaz carbonique dégagé, le pouvoir fermentaire des *Schizosaccharomyces* vis-à-vis de l'acide *l*-malique. 4 g de poids frais de levures centrifugées (soit environ 1 g en poids sec) peuvent faire fermenter, en une heure à 25°C, jusqu'à 100 mg d'acide *l*-malique. Donc en 5 heures par exemple, il est possible avec 200 mg de levures fraîches de transformer complètement l'acide *l*-malique de 5 ml de solution à 5 g par l, conditions opératoires convenables dans la pratique analytique. L'expérience directe confirme effectivement ce rendement, si l'on se place dans les conditions optimales.

Il s'agit en somme d'un dosage microbiologique réalisé par l'addition de cellules apportant le complexe enzymatique nécessaire ; nous verrons que seules des cellules vivantes peuvent effectuer cette transformation. La réaction obéit à différents facteurs concernant : 1^o la nature et la qualité des levures conditionnant leur activité, c'est-à-dire leur richesse en enzymes : propriété spécifique de

la souche, nature et composition du milieu initial de culture, âge et état d'activité des cellules ; 2° les conditions dans lesquelles se déroule la réaction : poids de levures utilisé, c'est-à-dire quantité d'enzymes mise en œuvre, température, pH, état d'aération, agitation, durée de la réaction ; 3° la nature du milieu contenant l'acide malique à doser : forme *l* ou *dl*, concentration, présence de glucides, d'alcool, d'anhydride sulfureux, etc.

Nous avons étudié l'influence de ces facteurs afin d'établir les conditions les meilleures de dosage. La technique d'essai est la suivante. Dans un premier temps on laisse se développer la souche de *Schizosaccharomyces* dans le milieu choisi. Après un certain temps d'incubation, on recueille les levures par centrifugation, on les lave, les pèse et les met en suspension dans un volume de solution convenable. Dans un deuxième temps, les essais proprement dits consistent à ajouter à un faible volume de prise d'essai du vin ou du liquide à doser, d'acidité connue, un volume suffisant de suspension de levures ; on attend quelques heures dans des conditions déterminées de température et à la fin de la réaction on dose l'acidité restante ; l'acidité disparue correspond à l'acide *l*-malique que contenait la prise d'essai.

L'introduction de cellules vivantes a pour effet d'apporter, outre le complexe enzymatique impliqué dans la fermentation de l'acide malique, de nombreux autres enzymes et de provoquer des phénomènes inhérents à la vie de la cellule (pénétration, assimilation, libération de produits résultants du métabolisme des levures, etc.). Il était donc nécessaire de vérifier l'action de *Schizosaccharomyces pombe* sur les divers métabolites se trouvant dans les vins et dont la dégradation ou l'assimilation peut se produire avec libération ou retrait de produits agissant sur l'équilibre acides-bases du milieu.

ÉTUDE DES CONDITIONS OPTIMALES DE LA FERMENTATION DE L'ACIDE L-MALIQUE

Souche de Schizosaccharomyces pombe utilisée

Un grand nombre de souches de *Schizosaccharomyces* de la collection de la Station ont été déjà soumises au test de SEKUNOVA et ABRAMOVICH (1960) ; ce test consiste à déterminer la diminution d'acidité d'une solution assez concentrée d'acide *l*-malique (30 g par l) en présence d'un poids relativement important de levures (20 g par l) (PEYNAUD et coll., 1964). C'est la souche de *Schizosaccharomyces pombe* isolée

TABLEAU I

*Fermentation de l'acide l-malique par différentes souches
de Schizosaccharomyces pombe*

Dosages effectués sur 5 ml de solution d'acide malique à 4,90 g par litre

Poids de levures mis en œuvre en g par l (poids sec)	Acide <i>l</i> -malique fermenté par					
	<i>Schizo. pombe</i> (<i>liquefaciens</i>)		<i>Schizo. pombe</i> (205)		<i>Schizo. pombe</i> (Bages)	
	g/l	%	g/l	%	g/l	%
10	4,70	95	3,20	62	3,30	67
20	4,75	97	4,50	41	4,50	91
40	4,75	97	4,55	92	4,65	94

par OSTERWALDER (1926) d'un jus de raisin sulfité et nommée *liquefaciens* qui s'est montrée la plus désacidifiante. Elle a été à nouveau comparée à d'autres souches parmi les plus actives selon la technique d'essai précédemment décrite. Dans le pre

mier milieu de culture, elle a donné la récolte de levures la plus abondante : 6 g en poids frais pour un litre de milieu dans les conditions opératoires, contre 4,80 et 5,15 g pour les autres souches. Le tableau 1 permet de comparer les résultats de la fermentation de l'acide *l*-malique par trois souches différentes.

La souche *liquefaciens* est donc celle qui, toutes conditions égales, fournit, d'une part, le poids de levures le plus important et provoque, d'autre part, la fermentation totale de l'acide *l*-malique avec le poids minimum de levures. Parmi les souches étudiées c'est elle qui convient le mieux au dosage de l'acide *l*-malique.

Choix du milieu initial de culture

Schizo. pombe liquefaciens a été cultivé dans cinq milieux différents, ajustés tous à pH 3,5 :

1. Moût de raisin dilué deux fois (90 g de sucre environ).
2. Même milieu, enrichi avec 5 g par l d'extrait de levures.
3. Même milieu, enrichi avec 10 g par l d'extrait de levures.
4. Milieu synthétique tamponné par des citrates : cendres de levures, 6 g ; extrait de levures, 5 g ; facteurs de croissance aux doses optimales ; sucre, 100 g.
5. Même milieu, avec 10 g d'acide *l*-malique par l.
6. Même milieu avec 1 g d'asparagine par l.

TABLEAU 2

*Fermentation de l'acide l-malique par Schizosaccharomyces
développé sur différents milieux*
Dosages effectués sur 5 ml de solution d'acide *l*-malique à 4,95 g par litre,
avec 0,3 g de levures (poids frais)

Levures provenant de différents milieux de culture	Acide <i>l</i> -malique fermenté					
	Après 2 heures		Après 6 heures		Après 8 heures	
	g/l	%	g/l	%	g/l	%
1. Moût dilué	2,48	50	4,75	96	4,82	97
2. Moût dilué + 5 g extrait levures	1,47	29	4,60	93	4,60	93
3. Moût dilué + 10 g extrait levures	1,87	37	4,60	93	4,60	93
4. Milieu synthétique	2,08	42	4,40	89	4,62	94
5. Milieu synthétique + acide malique	2,00	40	4,60	93	4,80	97
6. Milieu synthétique + asparagine	2,40	48	4,82	97	4,88	98

Les levures sont recueillies après trois jours de développement à 25°C sous faible épaisseur au contact de l'air. Le dosage est effectué avec 0,3 g de poids frais pour 5 ml d'une solution d'acide *l*-malique à 4,95 g par l ; on place à l'étuve à 30°C et l'acide *l*-malique fermenté est déterminé après deux, six et huit heures (tabl. 2).

On constate que le milieu de culture le plus favorable à la production rapide de levures actives est le moût de raisin dilué ou le milieu synthétique enrichi en aspa-

ragine. L'addition d'extrait de levures au moût n'est pas nécessaire. Par ailleurs les levures développées en milieu synthétique à l'extrait de levures seul donnent des résultats moins satisfaisants.

Influence de l'âge des cultures

Nous avons utilisé pour le dosage de l'acide *l*-malique des levures séparées d'une même culture, mais à des moments différents. La comparaison a porté sur des levures âgées de 3, 8, 15 et 30 jours. Nous avons observé que les levures âgées de 3 jours font fermenter dans les conditions du dosage 97 p. 100 de l'acide *l*-malique de la prise d'essai, tandis que les levures âgées respectivement de 8 et 15 jours n'en transforment que 65 et 38 p. 100 et que les levures âgées d'un mois ont complètement perdu leur propriété de métaboliser cet acide. Cette activité est donc directement en rapport avec la proportion de levures vivantes, et seules les levures jeunes prélevées dans la phase logarithmique de multiplication font fermenter l'acide *l*-malique. Il est d'ailleurs indispensable d'utiliser ces levures dans les premières heures qui suivent leur séparation par centrifugation ; même la conservation en glacière à — 2°C diminue beaucoup leur activité et fait tomber la proportion d'acide *l*-malique transformée en 6 heures de 97 à 34 p. 100 seulement.

Température optimale de la réaction

Des dosages comparatifs ont été conduits à quatre températures différentes : 20, 25, 30 et 35°C. Les pourcentages d'acide *l*-malique fermenté ont été respectivement de 31, 43, 52 et 42 p. 100 en 3 heures et de 62, 92, 98 et 89 p. 100 en 6 heures. La totalité de l'acide malique est pratiquement transformée en 12 heures. On adoptera donc dans la suite de l'expérimentation la température de 30°C qui permet d'obtenir plus rapidement la fermentation complète de l'acide *l*-malique de la prise d'essai. Mais dans la pratique l'attente d'une nuit à une température voisine de 20°C est également utilisable.

Poids de levures mis en œuvre et durée de la réaction

Le poids de levures à utiliser peut varier suivant un certain nombre de facteurs et nos essais pour le déterminer ont comporté plusieurs conditions. Nous ne retiendrons ici que l'essai dans lequel nous avons fait varier la température et le poids de levures. Le tableau 3 montre que pour obtenir un dosage correct, il faut utiliser une quantité correspondant à 10 g de *Schizosaccharomyces* (poids sec) par litre, soit 50 mg pour une prise d'essai de 5 ml, lorsque la réaction est poursuivie 6 heures à l'étuve à 30°C et une quantité double si la température est de 25°C ou si la durée de réaction est réduite à 4 heures.

Le temps nécessaire pour atteindre la fermentation complète de l'acide *l*-malique dépend également de l'activité des levures, du poids utilisé, de la température. Le tableau 4 représente la marche de la réaction avec des levures plus ou moins actives. Ces résultats confirment qu'un délai de 6 heures est suffisant pour que soient fermentés 96 à 98 p. 100 de l'acide *l*-malique de la prise d'essai, lorsque les autres conditions sont les meilleures.

Deux autres facteurs ont encore une influence non négligeable sur la réaction : la fermentation de l'acide *l*-malique est en effet favorisée nettement par le contact de l'air au cours du dosage (l'oxygène assurant vraisemblablement la conservation de la vitalité des levures) et par une agitation intermittente remettant les levures en suspension.

TABLEAU 3

Poids de levures à utiliser pour obtenir la fermentation complète de l'acide l-malique
Dosages effectués sur 5 ml de solution d'acide *l*-malique à 4,95 g par litre
Durée de la réaction : 6 heures

Poids de levures mis en œuvre en g par litre (poids sec)	Acide <i>l</i> -malique fermenté			
	à 25°C		à 30°C	
	g/l	%	g/l	%
5	2,00	40	4,70	95
10	2,75	52	4,92	99
20	4,55	92	4,92	99
40	4,92	99	4,92	99
80	4,80	97	4,92	99

TABLEAU 4

Fixation de la durée de fermentation de l'acide l-malique
Dosages effectués à 30°C ; prise d'essai : 5 ml d'acide *l*-malique à 4,95 g par litre

Durée de la réaction en heures	Acide <i>l</i> -malique fermenté			
	par des levures fraîches		par des levures conservées 24 h à — 2°C	
	g/l	%	g/l	%
2	3,68	74	0,60	12
4	4,62	94	1,34	27
6	4,85	98	1,54	31
8	4,90	99	2,14	43
20	4,95	100	3,00	60

Nature de l'acide malique

Seul l'acide *l*-malique, qui est l'acide naturel des fruits, est fermenté par *Schizosaccharomyces*. Nous avons suivi parallèlement la fermentation d'une même quantité d'acide *l*-malique présentée aux levures sous la forme *l* et sous la forme *dl*. L'acide malique gauche de l'acide racémique synthétique est fermenté plus lentement que l'acide malique gauche des milieux naturels. Dans les conditions où une proportion

de 97 p. 100 de ce dernier est fermenté, 65 p. 100 seulement du premier sont transformés. Tout se passe comme si la présence d'acide malique droit inhibait la fermentation de l'acide malique gauche, en bloquant vraisemblablement une fraction du complexe enzymatique.

Présence de sucres dans le milieu à doser

Nous avons observé plusieurs fois l'effet inhibiteur des sucres sur la fermentation de l'acide *l*-malique en solution simple. Des additions par litre de 20 g de glucose, de fructose ou de saccharose abaissent de 20 à 25 p. 100 la quantité d'acide *l*-malique fermenté en 6 heures. La présence d'alcool aux concentrations rencontrées dans les vins diminue légèrement cette inhibition.

La fermentation incomplète de l'acide *l*-malique en milieu sucré (qui explique par ailleurs qu'au cours de la fermentation d'un moût de raisin par les *Schizosaccharomyces* l'acide *l*-malique disparaît rarement en totalité) interdit l'application du dosage à des milieux contenant trop de sucres réducteurs. Nous avons cherché à partir de quelle teneur en sucres réducteurs, le dosage de l'acide *l*-malique n'est plus réalisable, en appliquant le dosage à un vin sec additionné de quantités croissantes de sucre interverti. Le tableau 5 montre qu'ici la présence de 20 g de sucres réducteurs

TABLEAU 5

Influence des sucres réducteurs sur le dosage de l'acide l-malique
Dosages sur un vin blanc sec additionné de quantités croissantes
de sucre interverti. Teneurs en g par litre

Sucres réducteurs ajoutés	Acide malique dosé
Témoin	4,75
+ 10	4,75
+ 15	4,72
+ 20	4,72
+ 30	4,62
+ 50	4,62
+ 75	4,62
+ 100	4,62

ne modifie pratiquement pas les résultats du dosage et qu'au-dessus, et jusqu'à 100 g par litre, l'erreur en défaut ne dépasse pas 3 p. 100. Le dosage se réalise plus facilement en milieu naturel complexe qu'en solution simple. La détermination peut donc s'appliquer à un milieu sucré naturel à la condition de le diluer et d'abaisser sa teneur en sucre par précaution largement au-dessous de 100 g par litre ; la présence d'alcool est favorable.

L'inhibition par les sucres de la fermentation de l'acide *l*-malique peut s'expliquer par l'analogie des mécanismes utilisant vraisemblablement les mêmes enzymes dans la dégradation des deux substances.

Par ailleurs la présence d'alcool dans le milieu à doser ne modifie pas la capacité des *Schizosaccharomyces* de faire fermenter l'acide *l*-malique, tout au moins jusqu'à

une concentration de 16 p. 100 en volume, taux rarement dépassé dans les vins. La grande tolérance à l'alcool permet d'appliquer le dosage directement aux vins. L'alcool améliore le rendement dans les vins sucrés.

Quant à l'anhydride sulfureux libre que peuvent contenir certains vins, il gêne le dosage au-dessus de 50 mg par litre. Dans la pratique du dosage, il est possible de prévenir cet effet soit en diluant la prise d'essai dans le flacon où s'effectue la fermentation, soit en chassant l'anhydride sulfureux par une courte ébullition, soit encore en le bloquant préalablement par une addition suffisante d'acétaldéhyde.

Présence d'autres acides organiques

Nous avons mis en présence, dans les conditions du dosage, un poids de levures correspondant à 10 g par litre avec des solutions contenant 40 à 50 méq par litre des divers acides organiques des milieux de fermentation. Le tableau donne l'acidité restante après six heures. Comme on pouvait s'y attendre, les acides citrique, tartrique et lactique ne sont pas attaqués ; il en est de même de l'acide fumarique. L'acide acétique subit une dégradation de 3 p. 100 pour un taux initial de 3,12 g par litre et l'acide pyruvique de 24 p. 100 pour un taux initial de 3,61 g par litre. Ce dernier acide pourrait fausser le dosage de l'acide *l*-malique, mais les faibles taux habituellement rencontrés dans les vins (BLOUIN et PEYNAUD, 1963) et autres milieux naturels rendent cette erreur négligeable.

TABLEAU 6

*Acides organiques métabolisés par Schizosaccharomyces
dans les conditions du dosage
Teneurs en méq. par litre*

Acides	Acidité initiale	Acidité restante	% d'acide dégradé
Acétique	52	50	3,8
Citrique	45	45	0
Fumarique	48	48	0
Lactique	53	53	0
L-malique	73	2	96
Pyruvique	41	31	24
Tartrique	41	41	0

Rôle du pH du milieu à doser

La fermentation de l'acide *l*-malique par *Schizosaccharomyces* ne s'effectue bien qu'en milieu acide et exige un pH défini. Nous avons préparé des solutions d'acide *l*-malique au même titre de 4,70 g par litre, amenées ou tamponnées à divers pH : 1,0-2,1-2,8-4,0-5,0-6,0, et le dosage de l'acide *l*-malique a été appliqué à ces solutions. A pH 1,0 l'erreur en défaut est de 16 p. 100, à pH 2,1 de 7 p. 100, à pH 5,0 de 32 p. 100, à pH 6,0 de 72 p. 100. Les résultats sont corrects de pH 2,8 à 4,0. Il est donc indispensable d'amener à ces valeurs le pH des milieux à doser dans le cas où il s'en éloignerait.

Essai d'utilisation de Schizosaccharomyces lyophilisés

Nous devons à l'Institut Pasteur la préparation de quelques dizaines de grammes de poudre lyophilisée à partir de la souche *liquefaciens* ⁽¹⁾. Les levures ont été développées en milieu glucosé enrichi en extrait de levure et fortement aéré ; les levures séparées par centrifugation ont été remises en suspension dans un tampon phosphaté à pH 4,6 ; la suspension, après addition de lactose et d'extrait de levures, a été lyophilisée. Cette poudre contient approximativement 15 milliards de levures par gramme ; la proportion d'eau est de 30 p. 100 ; le nombre de levures vivantes mesuré sur boîte de Petri est de quelques pour cent.

Il est vraisemblable que la proportion des cellules vivantes de cette préparation doit être insuffisante pour assurer la fermentation de l'acide malique ; c'est bien ce que confirme l'utilisation directe qui montre qu'il n'y a pas désacidification quel que soit le poids de levure introduit. Devant les difficultés de mise au point d'une méthode de séchage qui respecterait mieux la vitalité des levures, les essais que nous avons conduits ont donc eu surtout pour but de fixer les conditions d'une technique préalable de régénération. Les meilleurs résultats ont été obtenus en délayant 0,5 g de *Schizosaccharomyces* lyophilisés dans 200 ml d'une solution nutritive contenant par litre : 40 g de glucose, 2 g d'asparagine, et les facteurs de croissance aux doses optimales et en plaçant cette suspension trois jours à 25°C. On utilise alors directement pour le dosage 25 ml de cette suspension sans séparer les levures par centrifugation.

DESCRIPTION DE LA MÉTHODE DE DOSAGE PROPOSÉE

5 ml du vin à doser débarrassé éventuellement de son acide sulfureux libre (ou 5 ml de la solution à doser amenée vers pH 3 s'il y a lieu) sont placés dans un erlenmeyer de 50 ml. Si le milieu est sucré on le ramène par dilution à 50 g par litre de sucres réducteurs. On ajoute un volume de suspension de *Schizosaccharomyces pombe*, souche *acidifaciens*, correspondant à 50 mg de levures en poids sec, soit environ 200 mg de poids frais. La suspension de levures est obtenue à partir de levures en activité prélevées dans la phase de croissance au troisième jour d'une fermentation conduite soit sur moût de raisin dilué deux fois, soit sur le milieu simple dont la composition est donnée au paragraphe précédent. Dans le premier cas les levures sont recueillies par centrifugation et lavées à l'eau distillée ; dans le second cas on emploie directement des parties aliquotes de la suspension dans le milieu de culture.

On mélange les levures et la prise d'essai et laisse reposer six heures à l'étuve à 30°C, ou une nuit à la température de 20°C. Des mélanges opérés de temps à autre accélèrent la réaction. Après ces délais, on chasse le gaz carbonique par agitation sous vide et on titre par la soude N/20 (*v*) en employant comme indicateur le rouge de phénol ou le bleu de bromothymol ; parallèlement on titre directement l'acidité

(1) Nous remercions M. P. BRÉCHOT, Chef de Service à l'Institut Pasteur, et M^{me} M. CROSON, de l'aide qu'ils nous ont apportée par la préparation de ces cultures lyophilisées.

du vin (v_0). Lorsqu'on utilise la suspension dans le milieu de culture, le titrage de v_0 se fait aussitôt après le mélange des levures à la prise d'essai.

$$\begin{aligned}(v_0 - v) \times 10 &= \text{acide malique en m\acute{e}q par litre} \\ (v_0 - v) \times 0,67 &= \text{acide malique en g par litre}\end{aligned}$$

EXAMEN CRITIQUE DE LA M\'ETHODE

La m\'ethode propos\'ee est sp\'ecifique, les r\'esultats du tableau 6 le montrent d\'ej\`a. D'autre part, elle donne toujours z\'ero pour des vins blancs ou rouges ou des milieux qui n'ont pas d'acide *l*-malique. On obtient des r\'esultats valables \`a la condition de se placer dans les limites des modalit\'es d'application fix\'ees, concernant notamment l'acide sulfureux libre, le taux de sucre, la teneur en alcool, le pH. L'acidog\'en\`ese est nulle \`a partir du sucre, mais la r\'eaction est ralentie. Les teneurs en ammoniacque des vins sont trop faibles pour qu'une assimilation \\'eventuelle vienne perturber le dosage ; dans certains mo\`uts il peut en \^etre diff\'eremment bien que la fixation ne soit que partielle.

La m\'ethode a la sensibilit\'e des titrages acidim\'etriques, particuli\`erement grande, mais ici limit\'ee puisqu'il s'agit d'une technique par diff\'erence.

La m\'ethode est exacte et permet par exemple de retrouver une addition pr\'ecise faite \`a un vin, comme le montre le tableau 7. Dans les vins, l'\'\e'cart entre la valeur

TABLEAU 7

Contr\^ole de l'exactitude de la m\'ethode

Dosage sur un vin rouge additionn\'e de quantit\'es connues d'acide *l*-malique
Teneurs en g par litre

Teneur exacte en acide <i>l</i> -malique	R\'esultat du dosage (moyenne de 2 dosages)	\'\e'cart (%)
0	0	—
1,00	1,00	0
2,00	1,98	— 1
3,00	2,96	— 1,3
4,00	4,00	0
5,00	4,92	— 1,6
6,00	5,86	— 2,3
7,00	6,75	— 3,5
8,00	7,63	— 4,6
10,00	8,66	— 13,4

r\'eelle (connue par une addition par exemple) et la valeur trouv\'ee exp\'erimentalement est faible et pratiquement n\'egligeable jusqu'\`a une teneur de 6 g par litre ; au-dessus de cette concentration, on doit r\'eduire l'importance de la prise d'essai. En solution pure, on note une erreur syst\'ematique par d\'efaut de 3 p. 100. La m\'ethode donne des r\'esultats tr\'es proches des autres m\'ethodes de dosage de l'acide *l*-ma-

lique (chimique, chromatographique, enzymatique, manométrique) (PEYNAUD et BLOUIN, 1965).

La reproductibilité des résultats est très bonne. L'erreur type calculée pour des séries de dosages sur un même milieu est $\pm 0,1$ g. L'exemple suivant concerne un vin de Vouvray peu sucré de la récolte 1962 :

Échantillon	Acide <i>l</i> -malique (g par l)	Écart avec la moyenne ($x_i - \bar{x}$)	($x_i - \bar{x}$) ²
—	—	—	—
1	4,00	+ 0,11	0,012
2	4,00	+ 0,11	0,012
3	3,78	— 0,11	0,012
4	3,81	— 0,08	0,006
5	3,88	— 0,01	0,000
Moyenne	3,89	—	$\Sigma 0,042$

$$\delta = \sqrt{\frac{\Sigma (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} = \sqrt{\frac{0,042}{4}} = 0,1$$

Ce qui signifie qu'un degré de confiance de 70 p. 100 peut être accordé à un dosage individuel à ± 100 mg près et de 95 p. 100 à ± 200 mg près, soit ± 3 méq par litre.

Enfin cette technique de dosage de l'acide *l*-malique nous paraît d'une grande simplicité d'exécution. La culture préalable des levures peut être rendue très aisée et à la portée de tous les opérateurs, si avec le flacon contenant une dose de levures lyophilisées sont livrés les sels nutritifs pour la préparation d'un volume de milieu. Une étuve à 25°C est souhaitable ; aucun autre appareillage n'est nécessaire, en dehors du matériel acidimétrique habituel.

Reçu pour publication en janvier 1965.

SUMMARY

STUDY OF A SIMPLE METHOD OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF MALIC ACID, APPLIED TO WINES, USING « SCHIZOSACCHAROMYCES POMBE »

Certain strains of *Schizosaccharomyces pombe* have the remarkable property of being able to ferment *l*-malic acid by transforming it into alcohol and carbon dioxide. Basing their work on this observation, the authors have been able to create a precise and simple method of quantitatively determining the malic acid in wines, a method which needs few manipulations and which comprises only two compared acidimetric titrations. The mode of operation consists basically in measuring after a sufficient time lapse the loss of titratable acidity of an experimental sample added to a suspension of young cells of *Schizosaccharomyces*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BLOUIN J. et PEYNAUD E., 1963. Présence constante des acides pyruvique et α -cétoglutarique dans les moûts de raisins et les vins. *C. R. Acad. Sci.*, **256**, 4521.
MAYER K. et TEMPERLI A., 1963. The metabolism of *l*-malate and other compounds by *Schizosaccharomyces pombe*. *Archiv. Mikrobiol.*, **46**, 321.

- OSTERWALDER A., 1926. *Schizosaccharomyces liquefaciens* n. sp., eine gegen freie schweflige Säure widerstandsfähige Gärhefe. *Zbl. Bakteriologie*, Abt. II, **66**, 228.
- PEYNAUD E., DOMERCQ S., BOIDRON A.-M., LAFON-LAFOURCADE S. et GUIMBERTEAU G., 1964. Étude des levures *Schizosaccharomyces* métabolisant l'acide *l*-malique. *Archiv. Mikrobiologie*, **48**, 150.
- PEYNAUD E. et LAFON-LAFOURCADE S., 1964. Dosage simple de l'acide *l*-malique à l'aide de *Schizosaccharomyces pombe*. *C. R. Acad. Sci.*, **258**, 5542.
- PEYNAUD E. et SUDRAUD P., 1964. Utilisation de l'effet désacidifiant des *Schizosaccharomyces* en vinification de raisins acides. *Ann. Technol. agricole*, **13**, 335.
- PEYNAUD E. et BLOUIN J., 1965. Comparaison de quelques méthodes de dosage de l'acide *l*-malique. *Ann. Technol. agricole*, **14**, 61.
- SEKUNOVA V. N. et ABRAMOVICH M. M., 1960. Sur la détermination des espèces de *Schizosaccharomyces* (en russe). *Mikrobiologija*, **29**, 770.
-

COMPARAISON DE QUELQUES MÉTHODES DE DOSAGE DE L'ACIDE L-MALIQUE

E. PEYNAUD et J. BLOUIN

Station agronomique et œnologique, Bordeaux (Gironde)

SOMMAIRE

Nous avons comparé dans ce travail cinq méthodes de dosage de l'acide *l*-malique (chimique, chromatographique, enzymatique, manométrique à l'aide de *Lactobacillus arabinosus* à l'appareil de Warburg et microbiologique à l'aide de *Schizosaccharomyces pombe*) en les appliquant à six vins qui en contenaient 0,1 à 5 g par l. La comparaison porte sur la réalisation pratique du dosage et sur la valeur des résultats obtenus.

MÉTHODES DE DOSAGE UTILISÉES

Méthode chimique

On sait que cette méthode mise au point par PEYNAUD en 1938 est basée sur la production, par oxydation ménagée à l'aide de permanganate, d'une molécule d'acétaldéhyde à partir d'une molécule d'acide malique. Nous renvoyons pour les détails opératoires à *Analyse et contrôle des vins* page 124 (RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD, 1958).

Le rendement molécule à molécule est facile à obtenir en solution pure grâce à un appareil d'oxydation bien adapté, permettant une affusion lente et régulière de l'agent oxydant au cours de l'ébullition. Dans les vins, la présence des acides tartrique et citrique impose une correction importante et complique le mode opératoire en obligeant à la détermination séparée de ces deux acides. L'exactitude de la méthode en souffre, le rendement en acétaldéhyde à partir de l'acide tartrique dépendant des conditions d'oxydation. Nous avons adopté ici le coefficient de correction $\frac{\text{méq d'acide tartrique}}{25}$.

La méthode est réputée d'application délicate. Elle est cependant à la base de nos connaissances actuelles sur tous les phénomènes œnologiques où l'acide malique est impliqué.

Méthode chromatographique

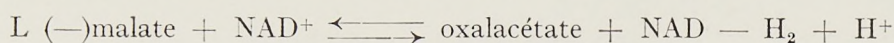
P. RIBÉREAU-GAYON a donné en 1958 une technique chromatographique s'appliquant directement au vin sans séparation préalable et permettant d'estimer la teneur en acide malique. On utilise généralement le mode opératoire simplifié de MICHOD (1959) dans lequel le solvant (butanol acétique) contient déjà le révélateur (bleu de bromophénol). On trouve les détails d'exécution de ces méthodes dans *Analyse et contrôle des vins*, page 127. Nous avons également utilisé la chromatographie après élimination préalable des cations par simple agitation de la prise d'essai avec une résine Dowex 50 (H⁺). On obtient les mêmes résultats, mais la décationisation permet d'obtenir des taches plus nettes et plus faciles à estimer quantitativement.

Méthode enzymatique

D'une manière générale les méthodes enzymatiques permettent le dosage très sensible et très spécifique de nombreuses substances des milieux naturels. Des substances instables, ou existant à faible concentration, ou difficiles à déterminer en milieu complexe par les méthodes traditionnelles leur sont accessibles. Ainsi BLOUIN (1964) les a utilisées à la détermination de l'acide pyruvique et de l'acide α -cétoglutarique dans les moûts et les vins. Nous renvoyons à ce travail qui développe les bases théoriques de ces méthodes.

L'acide *l*-malique est également dosable par voie enzymatique (HOHORST, 1962) et cette technique a été déjà appliquée aux vins par MAYER et BUSCH (1963).

La malicodéshydrogénase (MDH) catalyse la déshydrogénation de l'acide *l*-malique par l'intermédiaire du nicotinamide adénine dinucléotide (NAD) suivant la réaction :



On utilise l'hydrazine pour bloquer l'oxalacétate formé et permettre à la réaction d'équilibre de se poursuivre. Selon le principe du test optique de Warburg, on mesure la variation de densité optique à 340 m μ liée à la réduction du NAD.

En modifiant légèrement le mode opératoire de MAYER et BUSCH, nous opérons de la façon suivante. Dans deux cuves de 1 cm d'épaisseur on place :

— 2 ml de tampon glycolle-hydrazine à pH 9,6 (7,5 g de glycolle, 5,2 g de sulfate d'hydrazine, 0,2 g d'acide éthylènediamine tétracétique, 51 ml de soude 2N, et quantité suffisante d'eau pour 100 ml).

— 0,5 ml de vin dilué contenant 10 à 40 μ g d'acide *l*-malique dans la prise d'essai.

— 0,1 ml de NAD (en solution contenant 40 mg par ml d'eau).

Dans une cuve seulement on ajoute 0,02 ml de MDH.

La réaction est complète à la température ambiante en 15 à 20 minutes. La densité optique du milieu augmentant, même en l'absence de MDH, on suit pour chaque vin la variation de densité optique simultanément dans les deux cuves. La différence de densité optique à considérer est la différence entre les valeurs obtenues en palier (fin de la réaction) avec et sans MDH. On fait de même un essai à blanc avec 0,5 ml d'eau au lieu de vin.

Connaissant la valeur du coefficient d'extinction moléculaire du NAD-H₂, on peut calculer qu'une différence de densité optique de 1,00 correspond à 0,161 μ g. La teneur en acide *l*-malique (p.m. 134) en μ g dans la prise d'essai de 2,62 ml se calcule ainsi :

$$\Delta DO \times 0,161 \times 2,62 \times 134 = \Delta DO \times 56,5$$

Ainsi une incertitude de 0,005 sur ΔDO entraîne une incertitude de 0,28 μ g par 0,5 ml de vin dilué soit 14 mg par l pour une dilution de 25 fois et 113 mg par l pour une dilution de 200 fois ; la sensibilité de la méthode est donc très bonne.

Méthode manométrique

La décarboxylation de l'acide *l*-malique avec formation d'acide lactique par une souche de *Lactobacillus arabinosus* et mesure à l'appareil micromanométrique de Warburg du gaz carbonique dégagé a servi de base à un dosage de l'acide *l*-malique (RENTSCHLER, 1948 ; NOSSAL, 1951 et 1952 ; BOSSET et DUPUY, 1958 ; KOLAR, 1962).

Nous avons adopté, après études préalables des conditions, la méthode décrite par KOLAR, dont le mode opératoire est voisin de celui indiqué par BOSSET et DUPUY. Nous avons utilisé la souche de *Lactobacillus arabinosus* 17/5 ATCC 8014, qui sert par ailleurs au dosage de certains aminoacides et facteurs de croissance.

Dans les conditions opératoires la réaction dure 30 mn, mais on a intérêt à vérifier par une dernière lecture des manomètres après 45 mn, que le dégagement gazeux est terminé.

KOLAR a montré que l'alcool aux concentrations existant dans les vins et le sucre aux concentrations existant dans les moûts ne gênent pas le dosage. Nous avons observé, par contre, que la présence d'anhydride sulfureux libre, à partir de 50 mg par l, ralentissait la réaction et la rendait incomplète. L'anhydride sulfureux combiné à l'acétaldéhyde n'a aucune influence même à dose élevée. Une légère addition d'acétaldéhyde à des vins sulfités permet donc d'effectuer correctement le dosage.

Méthode utilisant Schizosaccharomyces pombe

Cette nouvelle méthode a été imaginée et décrite récemment par PEYNAUD et S. LAFON-LAFOURCADE (1964 et 1965). La conduite de ces essais comparatifs avait précisément surtout pour but de

vérifier l'exactitude de cette méthode qui n'exige pas de matériel spécial et ne comporte que des manipulations simples.

Il a été indiqué encore d'autres méthodes de dosage de l'acide malique : colorimétriques, polarographiques, polarimétriques, par chromatographie sur colonnes d'échangeurs d'ions. Mais notre intention dans ce travail se limitait à la comparaison des cinq méthodes actuellement utilisées ou à l'étude dans nos laboratoires. Nous n'avons pas étudié les autres méthodes et ne pouvons porter un jugement à leur égard.

RÉSULTATS ANALYTIQUES

Chaque méthode a fait l'objet de trois déterminations successives par un même opérateur pour une série de vins (blancs et rosés) ayant des teneurs variées en acide l-malique. Le tableau indique la valeur moyenne de trois dosages. Chaque méthode était appliquée par un analyste différent, exercé dans les manipulations qu'il avait contribué à mettre au point. Nous remercions M^{mes} LAFON-LAFOURCADE et BOIDRON et MM. MAURIE et GUIMBERTEAU de leur collaboration. On a noté dans chaque cas le temps nécessaire pour obtenir six résultats ; ce délai ne correspond pas toujours au temps de travail effectif qui est plus faible, notamment avec la méthode chromatographique et celle qui utilise *Schizo. pombe*, ces dosages comportant une certaine attente.

<u>Méthode</u>	<u>Durée</u>
Chimique	2 jours
Chromatographique	une demi-journée
Enzymatique	presque une journée, mais dans le même délai une vingtaine de dosages sont possibles
Manométrique	une demi-journée sans compter le temps de préparation de la suspension de <i>Lacto- bacillus arabinosus</i>
Utilisant <i>Schizo. pombe</i> .	presque une journée, sans compter le temps consacré à la culture proprement dite, mais on peut conduire dans le même temps une série très importante.

Comparaison des résultats de différentes méthodes de dosage de l'acide l-malique

Les valeurs indiquées, exprimées en méq par l, sont les moyennes de trois déterminations

	Méthode chimique	Méthode chromato- graphique	Méthode enzymatique	Méthode manométrique	Méthode <i>Schizo. pombe</i>
<i>Muscadet</i> 1962	4,0	0	1,8	2	1
<i>Tavel rosé</i> 1960	14,5	15	15,6	15	17
<i>Pouilly Fuissé</i> 1962	18,5	20	21,4	22	22
<i>Sauternes</i> 1961	38,0	45	42,4	37	38
<i>Vouvray</i> 1962.	53,0	60	52,5	54	58
<i>Entre-deux-Mers</i> 1962	68,0	75	67,5	70	71

CONCLUSIONS

Les résultats sont à première vue comparables entre eux : aucune de ces méthodes n'est entachée d'une erreur grossière ; il n'y a pas de méthode donnant des résultats systématiquement trop forts ou systématiquement trop faibles. Remarquons cependant que les deux premières sont capables de doser indistinctement l'acide *d*-malique et l'acide *l*-malique, alors que les trois autres dosent seulement l'acide gauche ; mais l'acide *d*-malique ne se rencontre pas dans les milieux naturels.

La précision comparée de chacune de ces méthodes serait à déterminer par l'analyse statistique d'un nombre plus important de résultats concernant un même échantillon, mais l'expérience et le calcul *a priori* joints aux essais en triple effectués, donnent malgré tout une indication valable.

1. La méthode chimique donne dans les meilleures conditions une incertitude de 2 à 3 méq par l, parfois plus pour les teneurs élevées (jusqu'à 5 méq). Quand les teneurs en acide malique sont faibles (moins de 10 méq par exemple), elle est incertaine et l'erreur relative est grande. Les résultats sont proportionnellement meilleurs lorsque l'acide malique est en quantité largement supérieure à l'acide tartrique. La correction de l'acide citrique peut être souvent négligée. Cette méthode nécessite de nombreuses manipulations dont certaines sont délicates. L'expérience montre cependant qu'entre les mains d'un personnel entraîné elle donne des valeurs très correctes. Elle fut longtemps la seule méthode connue.

2. L'estimation par chromatographie est reproductible à $\pm 0,5$ g par l, soit 7 à 8 méq. C'est davantage une évaluation semi-quantitative qu'un véritable dosage. Elle a toute son utilité lorsqu'il s'agit de reconnaître si la fermentation malolactique d'un vin est terminée ou non et c'est pour cet usage qu'elle a été proposée (P. RIBÉREAU-GAYON, 1953). Le procédé est simple et permet un grand nombre de déterminations en série ; il convient bien aux besoins du technicien vinificateur. Par contre, sa précision n'est pas suffisante pour chiffrer l'évolution de l'acide malique au cours d'un phénomène : maturation des raisins, fermentation alcoolique ou malolactique ; la méthode chromatographique reste surtout un procédé qualitatif.

3. La méthode enzymatique donne toujours pour un seul dosage un résultat approché à moins de 2 méq par l et cet écart pourrait être sûrement abaissé par un meilleur choix des conditions de dosage. Elle est très sensible (une dizaine de mg par l peuvent être détectés), assez rapide, précise, spécifique, mais elle nécessite un spectrophotomètre permettant des mesures dans l'ultra-violet (340 m μ) et l'utilisation de produits enzymatiques spéciaux, d'ailleurs faciles à se procurer. C'est une méthode qui convient particulièrement à la recherche.

4. La méthode manométrique utilisant la mesure de la décarboxylation de l'acide *l*-malique à l'appareil de Warburg est, comme la méthode enzymatique, sensible, spécifique et précise ; elle est surtout avantageuse lorsque le milieu contient des teneurs faibles en acide *l*-malique, difficiles à déceler par la chromatographie et à déterminer par la méthode chimique. Elle nécessite un appareil de Warburg et un personnel rompu à son maniement. La préparation des bactéries doit se faire à l'avance. Suivant l'organisation du laboratoire, elle peut être préférée ou non à la

méthode enzymatique ; elle est cependant plus sujette à l'erreur accidentelle et exige des mesures répétées. C'est un bon outil de recherche.

5. — La méthode microbiologique avec *Schizosaccharomyces pombe* est approchée à 2 méq près par l. 1 méq par l correspond à 0, 1 ml de soude N/20 pour 5 ml de vin et la méthode nécessite deux déterminations. Elle est très simple, exige peu de manipulations, mais réclame de l'opérateur un minimum de connaissance des techniques microbiologiques. C'est une méthode quantitative qui pourra être choisie par l'œnologue dans les cas où la précision de la méthode chromatographique est insuffisante.

On dispose donc actuellement, en définitive, pour doser l'acide malique des vins de deux techniques pratiques utilisables au niveau du laboratoire de technologie : semi-quantitative avec la chromatographie sur papier et quantitative avec l'emploi de *Schizosaccharomyces pombe*.

Pour le laboratoire de recherches, encore que la méthode précédente suffise souvent, on a le choix suivant l'équipement du laboratoire et la spécialisation du personnel, entre l'ancienne méthode chimique et les nouvelles méthodes enzymatiques et manométriques, ces dernières présentant des avantages indéniables de précision et de spécificité.

Reçu pour publication en janvier 1965.

SUMMARY

COMPARISON OF SOME METHODS OF QUANTITATIVE DETERMINATION OF L-MALIC ACID

The authors compared five methods of quantitative determination of *l*-malic acid (chemical, chromatographical, enzymatic, manometric with *Lactobacillus arabinosus*, and microbiological with *Schizosaccharomyces pombe*), applying them to several different wines. The comparison related to the actual method of determination and to the value of the results obtained. The authors recommend the method using *Schizosaccharomyces pombe* for laboratories production and the enzymatic method for laboratories research.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BLOUIN J., 1964. Application des méthodes enzymatiques optiques au dosage de certains constituants des boissons. *Chimie anal.*, **46**, 523.
- BOSSET R. et DUPUY P., 1958. Détermination de l'acide *l*-malique dans les boissons fermentées par décarboxylation enzymatique. *Ann. Technol. agric.*, **7**, 441.
- HOHORST H. J., 1962. L(—) Malat-Bestimmung mit Malatdehydrogenase und DPN. In BERGMAYER H. U., 1962. *Methoden der enzymatischen Analyse*. Verlag Chemie, Weinheim.
- KOLAR G. F., 1962. Manometric determination of *l*(—) malic acid in grape, musts and wines. *Amer. J. Enol. Vitic.*, **13**, 99.
- MAYER K. et BUSCH I., 1963. Über eine enzymatische Äpfelsäure-bestimmung in Wein und Traubensaft. *Mitt. Geb. Lebens. Unters. Hyg.*, **45**, 60.
- MICHOD J., 1959. Méthode simple de recherche de l'acide malique dans les vins par chromatographie sur papier. *Rev. romande Agric. Vitic. Arboric.*, **15**, 85.
- NOSSAL P. M., 1951. The decarboxylation of malic acid by *Lactobacillus arabinosus*. *Biochem. J.*, **49**, 407.
- NOSSAL P. M., 1952. Estimation of *l*(—) malate and fumarate by malic decarboxylase of *Lactobacillus arabinosus*. *Biochem. J.*, **50**, 349.
- PEYNAUD E., 1938. L'acide malique dans les moûts et les vins de Bordeaux. Nouvelle méthode de dosage. *Ann. Falsif. Fraudes*, **31**, 332.

- PEYNAUD E. et LAFON-LAFOURCADE S., 1964. Dosage simple de l'acide *l*-malique à l'aide de *Schizosaccharomyces pombe*. *C. R. Acad. Sci.*, **258**, 5542.
- PEYNAUD E. et LAFON-LAFOURCADE S., 1965. Étude d'un dosage simple de l'acide malique appliqué aux vins à l'aide de *Schizosaccharomyces pombe*. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 49.
- RENTSCHLER H., 1948. Methode für die quantitative Bestimmung der Äpfelsäure. *Mitteil. Geb. Lebens. Unters. Hygiene*, **39**, 30.
- RIBÉREAU-GAYON J et PEYNAUD E., 1958. *Analyse et contrôle des vins*. Ch. Béranger, Paris.
- RIBÉREAU-GAYON P., 1959. Méthode simple et expressive de caractérisation de la fermentation malolactique des vins. *C. R. Acad. Agric.*, **39**, 807.
- RIBÉREAU-GAYON P., 1954. Évaluation de l'acide malique par chromatographie sur papier. *Ann. Falsif. Fraudes*, **47**, 3.

CONTRIBUTION AU DOSAGE DES JUS DE FRUITS DÉTERMINATION DU PHOSPHORE, DU POTASSIUM, DU SODIUM ET DU CALCIUM

E. DITZ

*Laboratoires d'Analyses et de Recherches des É^{ts} Mero & Boyveau,
Grasse (Alpes-Maritimes)*

SOMMAIRE

La détermination de la teneur en jus de fruit d'une denrée est possible par le dosage d'un nombre suffisant de constituants du jus. Le phosphore, le potassium, le sodium et le calcium peuvent figurer parmi ces constituants. Des méthodes de dosage rapides et suffisamment sûres ont été mises au point pour ces quatre éléments.

I. — PRINCIPE DU DOSAGE DES JUS DE FRUITS

La détermination de la quantité de jus de fruit contenue dans une denrée est un problème posé de plus en plus souvent à l'analyste. Qu'il s'agisse de connaître le degré de concentration d'un jus concentré ou de doser la quantité de jus de fruit entrant dans la composition d'une boisson ou entrant dans la fabrication d'un arôme de fruit, ce problème présente toujours les mêmes difficultés.

On a cru autrefois que le dosage d'un seul constituant, par exemple des acides aminés sous forme d'indice de formol (DITZ 1960) suffisait à déterminer la quantité de jus de fruit contenue dans un mélange. Mais la composition des jus de fruits, comme celle de la plupart des liquides biologiques, est trop variable pour qu'une telle détermination puisse atteindre une précision acceptable. Ce fait est illustré par l'analyse de quelques jus de fraises de la campagne 1962 (tabl. 1).

Dans le tableau 2, nous avons indiqué pour chaque constituant dosé dans ces jus de fraises, les valeurs maximales et minimales trouvées, ainsi que la moyenne de ces valeurs et la dispersion des résultats autour de cette moyenne. Cette dispersion σt a été calculée d'après

$$\sigma t = \frac{t \sqrt{(x-m)^2}}{n-1} \quad \text{et} \quad (\sigma t)_{\text{rel}} = \frac{100 \sigma t}{m}$$

où t représente le coefficient de la table de Fischer (LACROIX, 1963), n le nombre d'essais, x la valeur trouvée et m la moyenne arithmétique des x . On peut penser que la dispersion des résultats est quelque peu différente d'une courbe de Laplace-Gauss et que seulement 75 p. 100 des résultats soient compris entre $m - \sigma t$ et $m + \sigma t$. (Si la dispersion était celle du pur hasard, 95 p. 100 des résultats se trouveraient entre ces limites).

Étant donné le petit nombre d'analyses effectuées, ces valeurs ne sont qu'approchées. Elles montrent tout de même que la détermination d'une teneur en jus de raisin basée sur le dosage d'un seul constituant, les cendres par exemple, n'a que 75 p. 100 de chances d'atteindre la précision de 100 ± 24 . Si le dosage portait sur les indices de formol, cette précision tomberait à 100 ± 79 et dans le cas du dosage du sodium à 100 ± 85 . Il est évident que de tels résultats ne sont d'aucune utilité.

TABLEAU I

Dosage	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
d_{4}^{20}	1,033	1,036	1,032	1,033	1,035	1,030	1,028	1,037	1,030	—
n_{D}^{20}	1,346	1,346	1,345	1,345	1,346	1,343	1,344	1,347	1,345	—
Cendres en %	0,55	0,47	0,40	0,48	0,46	0,52	0,50	—	—	—
Alc. cendres en méq. % g de jus	5,8	6,0	5,0	5,3	5,5	4,8	4,9	—	—	—
Sucres réd. en %	5,5	6,0	5,9	6,1	6,4	4,8	4,8	—	—	—
Extrait sec en %	7,8	8,7	7,6	8,4	8,9	7,0	7,5	9,5	7,6	—
Ext. sec — sucre en %	2,3	2,7	1,7	2,3	2,5	2,2	2,7	—	—	—
Acidité en méq % g de jus	15,6	16,2	15,2	16,5	16,2	17,3	15,8	11,5	11,3	19,1
Phosphore en mg % g de jus	13,8	17,7	10,5	12,4	13,3	9,9	9,7	19,2	13,2	13,2
Potassium en mg % g de jus	197	214	170	170	175	165	191	162	161	199
Sodium en mg % g de jus	0,8	0,8	0,6	0,6	0,6	0,7	0,6	1,4	1,1	1,1
Calcium en mg % g de jus	15,5	14,6	10,7	13,3	12,6	13,1	12,2	17,0	17,0	10,0
Indice de formol	23	19	19	14	15	9	15	8	9	12

Origine des fruits : 1. Vaucluse, 23 mai — 2. Vaucluse, 29 mai. — 3. Vaucluse, 1^{er} juin. — 4. Vaucluse, 5 juin. — 5. Vaucluse, 6 juin. — 6. Italie, 7. juin — 7. Italie, mi-juin. — 8. Finistère mi-juin. — 9. Finistère, 27 juin. — 10. Alpes-Maritimes, 6 juillet.

TABLEAU 2

Dosage	Nombre d'essais n	Maximum	Minimum	Moyenne m	Dispersion σ t	Dispersion relative (σ t) _{rel}
Cendres en %	7	0,55	0,40	0,483	± 0,117	± 24 %
Alc. cendres en méq % g de jus	7	6,0	4,8	5,33	± 1,13	± 21 %
Sucres réd. en %	7	6,4	4,8	5,64	± 1,55	± 28 %
Extrait sec en %	9	9,5	7,0	8,11	± 1,86	± 23 %
Ext. sec — sucres en %	7	2,7	1,7	2,34	± 0,85	± 36 %
Acidité en méq % g jus	10	19,1	11,3	15,47	± 5,19	± 34 %
Phosphore en mg % de jus	10	19,2	9,7	13,29	± 7,06	± 53 %
Potassium en mg % g de jus	10	214	161	180,4	± 41,7	± 23 %
Calcium en mg % g de jus	10	17,0	10,0	13,6	± 5,46	± 40 %
Sodium en mg % g de jus	10	1,4	0,6	0,81	± 0,69	± 85 %
Indice de formol	10	23	8	14,3	± 11,2	± 79 %

Toutefois l'examen détaillé de la composition d'un grand nombre de jus d'un même fruit montre que les divers constituants se comportent comme des paramètres indépendants. Certes une variation de la teneur en sucres agit dans le même sens sur le pourcentage d'extrait sec, tout comme une variation de la teneur en potassium agit sur la teneur en cendres et l'alcalinité de celles-ci, mais en revanche, d'autres constituants évoluent souvent en sens inverse. C'est le cas de la teneur en sucres et de l'acidité qui varient en sens opposé au cours de la maturation du fruit.

En faisant appel non pas à un seul composant, mais en dosant un grand nombre de ceux-ci, la détermination de la quantité de jus de fruit doit pouvoir se faire avec une beaucoup plus grande précision. Théoriquement, celle-ci doit atteindre 100 ± 15 (avec 95 p. 100 de chances), si on utilise les 11 constituants mentionnés au tableau 2.

La détermination de la teneur du produit en jus se présente alors de la façon suivante : On dose, dans le produit à analyser, un nombre de constituants aussi grand que possible et on exprime les résultats pour 100 g de denrée analysée. Le quotient des valeurs trouvées par la teneur moyenne du fruit en chacun de ces constituants fournit une teneur en jus de fruit. Évidemment on obtient pour chaque composant considéré une autre valeur de la teneur en jus, mais toutes ces valeurs se groupent autour d'une moyenne qui est d'autant plus précise que le nombre de constituants dosés est plus grand.

Pour nous rendre compte de cette précision, nous avons appliqué cette façon de calculer à chacun de nos dix jus de fraises, considéré comme un jus inconnu. Nous avons trouvé des résultats compris entre 89 p. 100 et 113 p. 100 au lieu des 100 p. 100 réels. Le calcul statistique montre que la précision (à 95 p. 100 de chances) est de 100 ± 18 , en bon accord avec nos prévisions.

Il arrive parfois que certaines teneurs en jus s'écartent beaucoup de la moyenne. L'écart peut provenir du fait que dans le jus employé le constituant dosé ne se trouvait pas à la concentration moyenne admise pour le calcul. En se référant alors aux teneurs limites, supérieure ou inférieure suivant le cas, connues pour ce constituant, on voit si l'anomalie constatée peut s'expliquer ainsi. Sinon, il faut admettre que ce même constituant a été introduit intentionnellement ou accidentellement dans la denrée (ajout de sucres ou d'acides dans une boisson, stabilisation d'un jus à usage industriel par un bisulfite etc.) ou que, au contraire, un traitement de la denrée a détruit partiellement ce constituant (acides aminés au cours d'un chauffage prolongé, par exemple). S'il est reconnu que le constituant litigieux se trouve effectivement en quantité anormale dans la denrée, ce constituant ne pourra être retenu pour le calcul de la teneur en jus.

La détermination de la teneur en jus de fruit ne peut donc se faire valablement que si l'on connaît pour chaque fruit les teneurs moyennes et extrêmes d'un nombre aussi grand que possible de composants. Les dosages de ces composants doivent en outre être rapides et suffisamment précis. Pour cette raison avons-nous étudié les dosages de quatre constituants indépendants, ceux du phosphore, du potassium, du sodium et du calcium qui compléteront les dosages classiques de l'acidité, de l'extrait sec, des sucres, des cendres, de l'alcalinité des cendres et de l'indice de formol.

II. — DOSAGE DU PHOSPHORE

Le phosphore a été dosé par colorimétrie du complexe phosphomolybdique réduit. Cette méthode est suffisamment précise et se prête particulièrement bien à des déterminations en série.

Pour l'exécution de ce dosage, nous nous sommes inspiré des travaux de MASATOSHI MIYAMOTO (1962) et de KORPACZY (1959). Du premier travail nous avons retenu l'opération en deux temps et la concentration des réactifs, du second la minéralisation en présence de magnésie. Par contre, nous n'avons pas réussi l'extraction du complexe bleu par le butanol, recommandée par cet auteur. Ce solvant, même spécialement épuré s'est toujours comporté comme un oxydant, décolorant plus ou moins vite les solutions. Par ailleurs, les jus de fruits sont suffisamment riches en phosphore pour que l'enrichissement en colorant soit inutile et ne constitue qu'une complication.

Les mesures d'absorption ont été faites à l'aide d'un spectrophotomètre Maroc II de la maison Jobin et Yvon, en utilisant des cuves de 1 cm de diamètre et en opérant à 820 μ m.

Entre 10 et 50 μg de phosphore par prise d'essai, la densité optique (0,17 à 0,85) est proportionnelle à la quantité de phosphore et la droite qui représente cette relation passe par l'origine. Il est toutefois bon de redéterminer la position de cette droite à chaque changement de réactif. A noter aussi que pour les densités optiques élevées, il est préférable de lire au galvanomètre les pourcentages de transmission et de calculer la densité optique ($E = 2 - \log T$).

Lors de chaque série de mesures (= ensemble d'essais chauffés en même temps), un essai à blanc est fait exactement dans les mêmes conditions. Sa solution sert de référence lors de la spectrophotométrie. Si les réactifs utilisés sont de pureté suffisante (Réactifs RP de Prolabo), la densité optique de l'essai à blanc, mesurée par rapport à l'eau pure, ne dépasse pas 0,03.

Réactifs

1. Magnésie calcinée.
2. Acide sulfurique pur environ 2 N.
3. Solution de 5,357 g de molybdate d'ammonium cristallisé, $\text{Mo}_7\text{O}_{24}(\text{NH}_4)_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$, dans 123 g d'acide sulfurique concentré pur, dilué au préalable à 250 ml par de l'eau distillée.
4. Solution saturée de sulfate d'hydrazine, diluée au 1/5 au moment de l'emploi.
5. Solution étalon de phosphore : 0,439 1 g de phosphate monopotassique, séché à poids constant à 105°, sont dissous dans 1 litre d'eau distillée et stabilisés par addition de 5 ml de chloroforme. Lors des dosages, cette solution est diluée au 1/10 et renferme alors 10 μg de phosphore par ml.

Mode opératoire

Environ 0,2 g de jus (de 0,1 g pour les jus riches tels que le cassis à 0,3 g pour les jus pauvres tels que la myrtille) sont exactement pesés dans un creuset en porcelaine de 30 ml de capacité. Ils sont recouverts par 0,500 g de magnésie et calcinés. Cette calcination est rapide et sa durée ne dépasse jamais trois heures.

Après refroidissement, la magnésie est dissoute par 15 ml d'acide sulfurique environ 2 N et la solution transvasée dans une fiole jaugée de 50 ml. Le creuset est rincé en deux fois par un total de 7 ml d'eau qui est rajoutée à la solution principale.

Ensuite on ajoute 2 ml de solution de molybdate, on bouche la fiole et on chauffe pendant 5 mn dans un bain-marie bouillant. Puis on ajoute 1 ml de solution diluée de sulfate d'hydrazine et on chauffe encore pendant 10 mn les fioles bien bouchées.

Après refroidissement, la solution est ajustée à 50 ml et la densité optique déterminée.

Étalonnage

Pour l'étalonnage, les 7 ml d'eau de rinçage sont partiellement remplacés par la solution étalon de phosphore à 10 μg par ml. Les autres manipulations sont les mêmes que pour les dosages.

Précision de la méthode

Au cours de deux séries de mesures faites sur un même jus de framboise par deux personnes différentes, nous avons obtenu les résultats suivants :

Opérateur A :	11,57	11,58	11,44	11,56	11,69	11,57
Opérateur B :	11,91	11,88	12,01	11,84	11,98	12,07

Moyenne des 12 essais : 11,76. Écart-type : $\sigma = \pm 0,213$ 7. Coefficient de la table de Fischer pour $n-1$ essais et une certitude de 95 p. 100 : $t = 2,201$

Précision de la méthode : $\sigma t = \pm 0,47$ ou $\pm 4,0$ p. 100. Si les dosages sont faits en double, la précision atteint $\pm 2,8$ p. 100.

Sous cette forme le dosage du phosphore est suffisamment précis pour pouvoir constituer un élément valable dans la détermination d'une teneur en jus de fruit.

III. — DOSAGE DES ÉLÉMENTS K, NA, CA.

Spectrophotométrie de flamme

Pour le dosage des éléments potassium, sodium et calcium, la spectrophotométrie de flamme s'imposait par sa simplicité. Elle a d'ailleurs souvent été recommandée pour l'analyse de plantes et de liquides biologiques (GUEGUEN, ROMBAUTS 1961; JOURET, POUX 1961; JOURET, 1961).

Restait à vérifier si elle pouvait s'appliquer à l'analyse des jus de fruits et surtout si ces jus pouvaient être injectés directement dans l'appareil, sans minéralisation préalable. Il nous importait aussi d'établir un mode opératoire simple, comportant l'emploi d'une courbe de référence afin d'éviter l'emploi de deux témoins encadrant, par leur composition, le jus à analyser.

Le point capital était l'étude de l'influence des différents constituants des jus sur l'émission de lumière par les cations à doser. On sait qu'il y a interaction entre les ions, anions et cations, présents dans la solution. En l'absence de minéralisation, les substances organiques du jus peuvent également agir sur l'émission.

Appareillage

L'appareil utilisé était le spectrophotomètre Maroc II, muni de son équipement spécial, comportant un brûleur oxy-acétylénique à vaporisation directe de la solution dans la flamme. Pour compenser l'instabilité relative de l'appareil, chaque lecture a été répétée 10 fois. Ceci assure une précision de la lecture meilleure que $\pm$ une demi-division du galvanomètre.

Les fentes de l'appareil étaient ouvertes au maximum en hauteur et au minimum en largeur, Le galvanomètre était réglé au maximum de sa sensibilité, soit 0,5 μ A pour la déviation totale.

Pour le dosage du potassium, nous avons utilisé le doublet à 768, 2 m μ , pour le sodium le doublet à 589,3 m μ et pour le calcium la bande à 622 m μ .

Interaction des constituants des jus

1. *Cations.* Dans les jus de fruits, les cations K, Ca et Na se trouvent très approximativement dans le rapport 100 : 10 : 1. C'est donc avant tout l'action du potassium sur l'émission du calcium et du sodium qui est à envisager, alors que l'émission du potassium risque fort peu d'être influencée par le calcium et encore moins par le sodium.

Pour nous rendre compte de l'importance de ces interférences, nous avons opéré sur des mélanges synthétiques ayant la composition d'un jus de framboises moyen (d'après nos travaux et d'après BORTICHER (1961)), ce jus étant supposé dilué cinq fois. Pour 100 nul, nos solutions renfermaient 1,000 g de saccharose, 0,400 g d'acide citrique et 3 mg de P.

Influence du potassium

K (en mg)	Ca (en mg)	Intensité de la bande (622 m μ du Ca)
—	—	—
25	1,3	100
40	1,3	113
55	1,3	139
K (en mg)	Na (en mg)	Intensité du doublet (589,3 m μ du Na)
—	—	—
25	0,10	97
40	0,10	95
55	0,10	92

L'augmentation apparente de l'émission du calcium est due à la superposition du fond continu du potassium à la bande du calcium. Elle est assez importante pour qu'il faille en tenir compte lors des dosages.

La faible diminution de l'intensité de la raie du sodium est plus difficile à expliquer.

Le calcium de son côté, ne peut agir notablement que sur l'émission du sodium. Les essais ont été faits avec des solutions renfermant, outre les ingrédients déjà mentionnés, 40 mg de potassium.

Influence du calcium

K (en mg)	Na (en mg)	Intensité du doublet (589,3 mμ du Na)
—	—	—
0	0,132	100
1,3	0,132	100,8
3,0	0,132	103,0

Pour faible qu'elle soit, l'influence du calcium n'est pas tout à fait négligeable lors des dosages, d'autant plus que dans les jus de framboise cinq fois dilués il peut se trouver jusqu'à 4,5 mg de calcium.

Les autres cations se trouvant dans les jus de fruits ne peuvent exercer qu'une action minime sur l'émission des métaux alcalins et alcalino-terreux précédemment étudiés.

2. *Anions minéraux.* Étant donnée la haute température de la flamme, seuls les ions PO_4^{---} et SO_4^{--} sont à redouter et ce dernier uniquement dans les jus additionnés d'anhydride sulfureux ou de bisulfite, la quantité de soufre naturel étant très faible.

La présence des ions phosphoriques se manifeste très faiblement dans l'émission du potassium, nettement dans celle du sodium et très fortement dans celle du calcium. Ainsi l'introduction de 27 mg de P dans 100 ml d'une solution renfermant 50 mg de K, 0,5 mg de Na et 5 mg de Ca, fait passer l'émission du potassium de 79 à 77 divisions du galvanomètre, celle du sodium de 80 à 75 et celle du calcium de 79 à 69.

Quoique dans un jus de framboise cinq fois dilué la teneur en P ne dépasse pas 4 à 5 mg pour 100 ml, il sera bon d'introduire dans les solutions étalons une quantité de phosphore voisine de celle se trouvant dans le jus à analyser.

TABLEAU 3

Potassium : 30 mg dans 100 ml de solution.

Sucre ajouté à 100 ml.....	0,5 g	1,0 g	1,5 g	2,0 g	2,5 g
Augmentation apparente.....	8,0 %	10,0 %	12,5 %	14,5 %	17,0 %

Calcium : 3 mg dans 100 ml de solution.

Sucre ajouté à 100 ml.....	0,5 g	1,0 g	1,5 g	2,0 g	2,5 g
Augmentation apparente.....	13,0 %	21,0 %	24,0 %	25,5 %	26,0 %

Sodium : 0,3 mg dans 100 ml de solution.

Sucre ajouté à 100 ml.....	0,5 g	1,0 g	1,5 g	2,0 g	2,5 g
Augmentation apparente.....	11,0 %	17,5 %	20,5 %	23,0 %	25,5 %

3. *Constituants organiques.* a) *Sucres.* Des essais ayant montré que le saccharose et le dextrose avaient la même influence, nous avons utilisé le saccharose qui se trouve dans le commerce avec une très faible teneur en cations, alors que le dextrose, même cristallisé, n'en est pas exempt. L'influence de faibles quantités de saccharose se traduit par un renforcement de la lumière émise par les trois cations, donc par une augmentation apparente de la quantité de cations présents (tabl. 3).

b) *Acide citrique.* Cet acide provoque un renforcement de l'émission de lumière des cations alcalins et ce renforcement varie en fonction inverse de la quantité d'acide ajouté. Pour le calcium, par contre, l'acide provoque une forte dépression de l'émission de lumière qui semble passer par un minimum lorsque la quantité d'acide augmente (tabl. 4).

TABLEAU 4

<i>Potassium</i> : 40 mg dans 100 ml de solution.				
Acide citrique ajouté à 100 ml	0,2 g	0,4 g	0,6 g	
Variation apparente	+ 4,0 %	+ 2,0 %	+ 0,8 %	
<i>Calcium</i> : 1,3 mg dans 100 ml de solution.				
Acide citrique ajouté à 100 ml	0,2 g	0,4 g	0,6 g	
Variation apparente	— 15 %	— 16 %	— 11 %	
<i>Sodium</i> : 0,13 mg dans 100 ml de solution.				
Acide citrique ajouté à 100 ml	0,2 g	0,4 g	0,6 g	
Variation apparente	+ 4,0 %	+ 1,5 %	+ 1,5 %	

Les solutions étalons devront donc contenir des quantités de sucre et d'acide citrique égales à celles du jus à analyser.

COURBES DE RÉFÉRENCES

La meilleure méthode de dosage consiste à comparer le jus dilué (environ 5 g, exactement pesés et dilués à 25 ml) à deux solutions étalons renfermant les mêmes quantités de sucre, d'acide citrique et de phosphore que le jus dilué, mais des quantités de potassium, de calcium et de sodium se trouvant de part et d'autre et aussi près que possible de celles du jus.

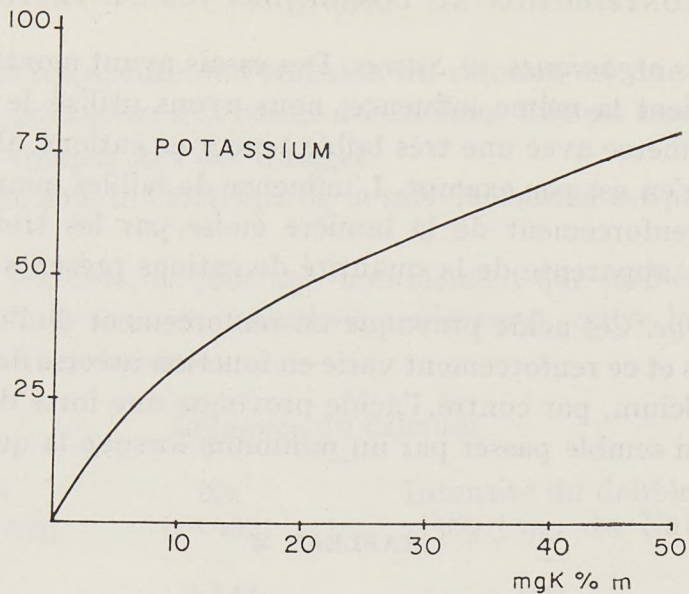
Ceci suppose connue la teneur du jus en ces cations, donc un dosage approché préliminaire. Celui-ci peut se faire à l'aide de courbes de références. Nous verrons plus loin que celles-ci permettent dans bien des cas des dosages définitifs.

Le nombre d'interférences constatées pourrait être un obstacle insurmontable à l'établissement de telles courbes. En réalité, il se trouve que les courbes représentant la déviation du galvanomètre en fonction de la concentration en cation sont identiques quelle que soit la quantité d'élément perturbateur ; seule la position des courbes diffère. Il suffit donc d'utiliser pour le réglage de l'appareil une solution étalon renfermant, en plus du cation à doser, exactement autant de sucres, d'acide, de phosphore et, éventuellement, de potassium et de calcium que le jus dilué à analyser. Si on règle l'appareil pour avoir une déviation du galvanomètre égale à celle prévue par la courbe pour la quantité de cation contenue dans le témoin, l'ensemble de la courbe est valable.

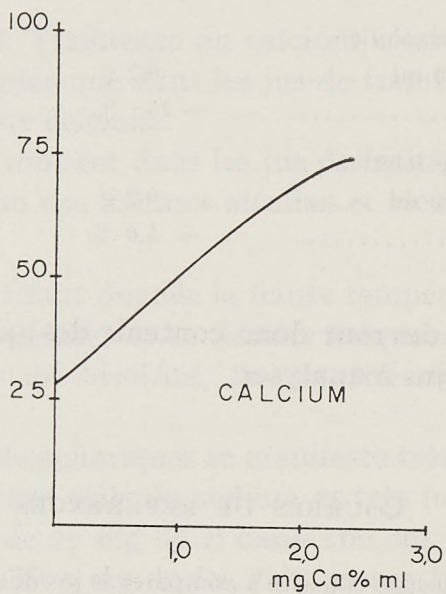
A titre d'exemple, nous reproduisons les courbes obtenues pour le potassium, le calcium et le sodium avec notre installation. Les solutions utilisées pour l'établissement de ces courbes renfermaient pour 100 ml : 1,000 g de saccharose, 0,400 g d'acide citrique, 0,003 g de phosphore (sous forme d'acide phosphorique) et une quantité variable de l'un des cations, la quantité des deux autres étant maintenue constante. Ces quantités constantes étaient respectivement de 0,040 g de potassium, 0,0013 g de calcium et 0,00013 g de sodium.

Comme limite supérieure des courbes de références, nous avons choisi des teneurs en cation suffisamment élevées pour englober la majorité des jus de framboises, mais pas trop élevées pour

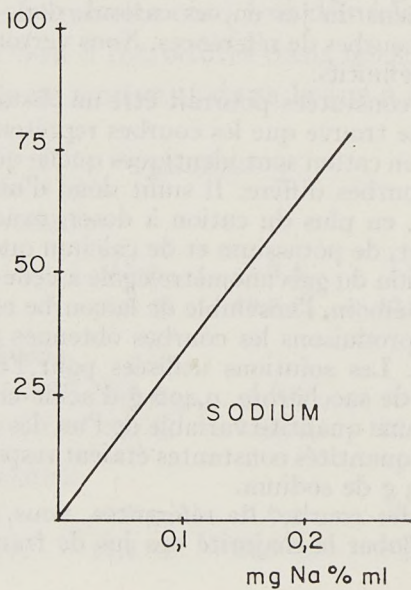
Divisions du
galvanomètre



Divisions du
Galvanomètre



Divisions du
Galvanomètre



laisser à la courbe une pente compatible avec une lecture précise. Pour d'autres fruits, des limites différentes peuvent s'imposer.

On constate que la courbe du potassium est convexe vers le haut à cause de la réabsorption de la raie 768 m μ dans les couches plus froides du brûleur. La courbe du sodium est presque rectiligne et passe, comme celle du potassium, par l'origine. Par contre, celle du calcium est en forme de S très allongé (ionisation pour les faibles teneurs et réabsorption à plus forte concentration), mais elle ne passe pas par l'origine. Ce décalage n'est pas dû à la présence de calcium parasite, mais au fond continu du spectre du potassium.

DOSAGES

Pour la préparation des solutions étalons, nous avons utilisé des solutions mères préparées elles-mêmes à l'aide d'un poids connu de sels purs (KCl, NaCl et CaCO₃ exempt d'alcalis RP de Prolabo). L'eau employée pour leur préparation était épurée par passage sur des résines échangeurs d'ions et avait une résistivité supérieure à un mégohm /cm. Les solutions étaient conservées dans des récipients en polyéthylène.

Tous les réactifs ont été trouvés suffisamment purs sauf le KCl qui renfermait du sodium (0,031 p. 100) dont il fallait tenir compte lors de la préparation des solutions étalons de sodium.

Dans un premier temps du dosage, il convient de déterminer la teneur en P, l'acidité du jus exprimée en acide citrique et les sucres exprimés en glucose.

Tous ces dosages préliminaires ne constituent nullement une complication de notre méthode puisque celle-ci est le plus souvent employée dans le cadre d'un dosage de jus de fruit où la connaissance des teneurs en sucres, extrait sec, acidité et phosphore est indispensable. Si la denrée à analyser n'est pas un jus simple, ces analyses préliminaires complétées éventuellement par les dosages des cendres, de l'alcalinité des cendres et par l'indice de formol, permettent déjà de se faire une idée de la teneur approximative en jus simple. On procède alors à une dilution (en poids dans un volume connu) correspondant à environ 5 g de jus simple dans 25 ml.

D'autre part, on prépare une solution étalon renfermant le phosphore, le sucre (saccharose à la place des sucres réducteurs) et l'acide citrique à la même concentration que la solution de la denrée à analyser et en plus 40 mg de K pour 100 ml. Le spectrophotomètre est réglé de telle façon que le galvanomètre dévie avec cette solution du nombre de divisions correspondant sur la courbe de référence à ce taux de K (70 divisions dans notre cas), le zéro de l'appareil étant réglé en pulvérisant une eau de même qualité que celle qui a servi à la préparation des solutions étalons et à la dilution de l'échantillon à analyser. La substitution de la solution à analyser à la solution étalon fournit une nouvelle indication du galvanomètre que la courbe de référence permet de traduire en teneur en K.

Un deuxième témoin est alors préparé renfermant les mêmes quantités de substances perturbatrices plus la quantité trouvée de K et une quantité connue de Ca (par exemple 1,3 mg p. 100 ml correspondant à 57 divisions du galvanomètre). Cette solution sert à régler l'appareil pour le dosage du calcium.

On procède de même pour le Na en utilisant une solution témoin renfermant les corps perturbateurs, le potassium et le calcium aux taux trouvés et en plus une quantité connue de Na (0,13 mg pour une déviation de 47 divisions).

PRÉCISION DES RÉSULTATS

La précision des résultats fournis par les courbes de références est avant tout fonction de la lecture du galvanomètre et de l'allure de ces courbes. L'indication du galvanomètre étant sûre à plus ou moins une demi-division près, la teneur en potassium peut être déduite de la courbe à $\pm 1,1$ p. 100 près pour une teneur de 40 mg, et à $\pm 3,2$ p. 100 près pour une teneur de 5 mg pour 100 ml de solution. Pour le sodium, l'incertitude va de $\pm 0,8$ p. 100 (solution à 0,20 mg p. 100 ml) à ± 3 p. 100 (solution à 0,05 mg p. 100 ml) et pour le calcium de $\pm 2,3$ p. 100 (solution à 2,2 mg p. 100) à $\pm 4,6$ p. 100 (solution à 0,5 mg p. 100 ml).

L'incertitude due aux pesées et aux dilutions est faible par rapport à celle que nous venons de constater. Néanmoins avons-nous tenu à vérifier expérimentalement la précision de nos dosages en faisant analyser un même jus de framboise plu-

siieurs fois de suite par deux opérateurs différents (A et B). Les résultats suivants furent obtenus :

Potassium (en mg p. 100 g de jus)

Opérateur A :	132	130	130	129	131	130	135
Opérateur B :	134	132	129				

Moyenne des 10 essais : 131,2. Écart-type : $\sigma = \pm 2,044$. Coefficient de la table de Fischer pour $n-1$ essais et une certitude de 95 p. 100 : $t = 2,262$

Précision du dosage : $\sigma t = \pm 4,62$ ou $\pm 3,5$ p. 100.

Calcium (en mg p. 100 g de jus)

Opérateur A :	2,92	2,93	2,86	2,90
Opérateur B :	2,98	2,90	2,90	

Moyenne des essais 7 : 2,913. Écart-type : $\sigma = \pm 0,03683$. Coefficient de la table de Fischer pour $n-1$ essais et une certitude de 95 p. 100 : $t = 2,447$. Précision du dosage : $\sigma t = \pm 0,090$ ou $\pm 3,1$ p. 100.

Sodium (en mg p. 100 g de jus)

Opérateur A :	0,182	0,181	0,184	0,177	0,187
Opérateur B :	0,185	0,177	0,178	0,180	0,180

Moyenne des 10 essais : 0,1811. Écart-type : $\sigma = \pm 0,003415$. Coefficient de la table de Fischer pour $n-1$ essais et une certitude de 95 p. 100 : $t = 2,262$. Précision du dosage : $\sigma t = \pm 0,00772$ ou $\pm 4,3$ p. 100.

TABLEAU 5

	Teneur du jus en mg	Surcharge en mg	Total en mg	Trouvé en mg	Écarts en mg	Écart en % de l'ajout
Potassium	27,1	8,0	35,1	35,5	+ 0,4	+ 5,0
	27,0	16,0	43,0	43,6	+ 0,6	+ 3,8
	27,0	24,0	51,0	53,1	+ 2,1	+ 8,8
Calcium	0,57	0,40	0,97	0,95	— 0,02	— 5,0
	0,57	0,60	1,17	1,18	+ 0,01	+ 1,7
Sodium	0,016	0,010	0,026	0,025	— 0,001	— 10,0
	0,016	0,015	0,031	0,032	+ 0,001	+ 6,7

Pour le potassium et le calcium, la reproductibilité des résultats est en accord avec l'incertitude provenant des lectures du galvanomètre et des courbes. Pour le sodium, elle est moins bonne, probablement pour des raisons de contamination, inévitable pour un élément aussi répandu, et d'autant plus influente que la quantité de sodium à doser est très faible.

Outre la reproductibilité des résultats, nous avons également testé leur exactitude en ajoutant des quantités connues de cations à un jus de framboise et en dosant cet ajout par différence (tabl. 5).

Les écarts observés sont tout à fait normaux si l'on considère que le résultat est obtenu par différence, c'est-à-dire que son incertitude est double de celle d'un dosage simple.

CONCLUSION

On peut dire que la méthode proposée pour le dosage des éléments potassium, sodium et calcium est utilisable pour le dosage des jus de fruits, car l'incertitude des résultats ne dépasse en aucun cas ± 5 p. 100, alors que les fluctuations dues à la nature même des fruits sont beaucoup plus importantes.

IV. CONCLUSIONS

Le dosage des jus de fruits dans des denrées est en général possible et atteint une précision acceptable s'il est basé sur la détermination d'un nombre suffisamment grand de constituants du jus de fruits.

Les méthodes de dosage du phosphore, du potassium, du sodium et du calcium exposées dans cet article peuvent contribuer efficacement au dosage des jus de fruits dans un mélange.

Reçu pour publication en janvier 1965.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE DOSAGE OF FRUIT JUICES, DETERMINATION OF PHOSPHORUS, POTASSIUM, SODIUM AND CALCIUM

The determination of the content of fruit juices in a product is possible by analysing quantitatively a sufficient number of the juice constituents. Phosphorus, potassium, sodium and calcium can be included in these constituents.

The conditions for the determination of phosphorus by spectrophotometry of the blue phosphomolybdic complex have been specified. The determination of the potassium, sodium and calcium elements by flame spectrophotometry has been investigated. This determination is possible and can be obtained with the help of reference curves, but it is absolutely necessary to take into account the interactions between these three cations and the influence of the phosphoric ions, the sugars and the citric acid.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BÖTTICHER W., 1961. Bibliographie à la fin de l'article : Qualitätsüberwachung der Pilz- und Waldbeerenernte 1961 im Bayerischen Wald und in der Oberpfalz und Kennzahlen der Himbeermuttersäfte. *Ind. Obst- und Gemüseverwert.* **46**, 601-605.
- DITZ E., 1960. L'indice de formol des jus de fruits. *Ind. agric. alim.*, **77**, 685-691.
- DITZ E., 1962. Dosage des jus de fruits par l'indice de formol. *Parf. Cosm. Sav.* **5** 46-50.

- GUÉGUEN L. et ROMBAUTS P., 1961. Dosage du sodium, du potassium, du calcium et du magnésium par spectrophotométrie de flamme dans les aliments, le lait et les excréta. *Ann. Biol. animal Bioch. Biophys.* **1**, 80-97.
- JOURET C. et POUX C., 1961. Étude d'une technique de dosage du potassium par spectrophotométrie de flamme dans les vins et les moûts. *Ann. Technol. agric.* **10**, 351-359.
- JOURET C., 1961. Étude d'une technique de dosage du sodium dans les vins et les moûts par spectrophotométrie de flamme. *Ann. Technol. agric.* **10**, 361-368.
- KORPACZY I., 1959. Eine Halb-Mikromethode zur kolorimetrischen Bestimmung des Phosphor-Gehaltes in Lipoiden. *Fette, Seife, Anstrichm.* **61**, 748.
- LACROIX Y., 1963. Le calcul statistique au laboratoire d'analyse. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **1963**, 892-898.
- MASATOSHI MIYAMOTO, 1962. Absorptimetric determination of phosphorus. I. Determination of phosphorus as heteropoly blue by hydrazine reduction. *Bunseki Kagaku*, **11**, 511-516 (in *Chem. Abstr.*, **57**, 6607 e.)

SUR LES PARTICULARITÉS DU DOSAGE SPECTROPHOTOMÉTRIQUE DES ANTHOCYANNES

M. B. PATAKY

Institut ampélologique, Budapest (Hongrie)

SOMMAIRE

L'intensité de la coloration des anthocyanes dépend de la concentration des ions-hydrogène dans le milieu, d'où la nécessité d'ajuster exactement le pH à une valeur optimale, lors du dosage spectrophotométrique de ces substances.

INTRODUCTION

Le nombre des publications concernant le dosage et la stabilité des anthocyanes est toujours en augmentation. Une des plus récentes est celle de SONDHEIMER (1953) dans laquelle la constante de dissociation est calculée en considérant l'anthocyanne utilisée comme indicateur de pH. Partant de ces résultats, BERG (1963) a évalué par calcul la forme oxonium des anthocyanes dans les vins.

D'autre part, les méthodes de dosage des anthocyanes sont basées presque entièrement sur la spectrophotométrie, précédée parfois d'une séparation. Étant donné les modifications de couleur des anthocyanes avec le pH, la plupart des auteurs préconisent un ajustement du pH de la solution contenant l'anthocyanne à doser. Ainsi, par exemple, un milieu contenant 1 p. 100 d'acide chlorhydrique est prescrit par P. RIBÉREAU-GAYON (1961). DOURMISCHIDSE et KHATCHIDZE (1951-1952) ont fixé un rapport d'eau et d'alcool éthylique 1:1 avec le pH 1,2 — 1,4, DEIBNER, BOURZEIX, CABIBEL-HUGUES (1964), ont utilisé la solution décimale d'acide chlorhydrique. L'état actuel du dosage spectrophotométrique des anthocyanes est résumé dans cette publication même.

La courbe de densité optique de monoglucoside du pélagonidol, donnée par SONDHEIMER (1953), montre que la sensibilité en fonction du pH de ce pigment est

autour de — 0,8 p. 100 à pH 1, supérieur à — 2 p. 100 à pH 2 et devient — 11,5 p. 100 à pH 3. Le terme « sensibilité en fonction du pH » est défini comme le changement en (relatif ou absolu) pour cent de la densité optique pour une variation du pH de 0,1, le signe « — » indiquant la diminution de la densité optique avec l'augmentation du pH. Les données citées, ont été obtenues en utilisant la longueur d'onde de 500 m μ . Les conséquences analytiques de ce phénomène ne sont pas traitées dans cette communication.

On peut également attirer l'attention sur l'importance de la valeur du pH dans la détermination des courbes d'absorption des vins ou des anthocyanes, bien qu'au cours des travaux récents de MARECA et GONZALEZ (1964) les solutions étaient caractérisées par leur taux en acide acétique, (25 p. 100), et non par leur pH.

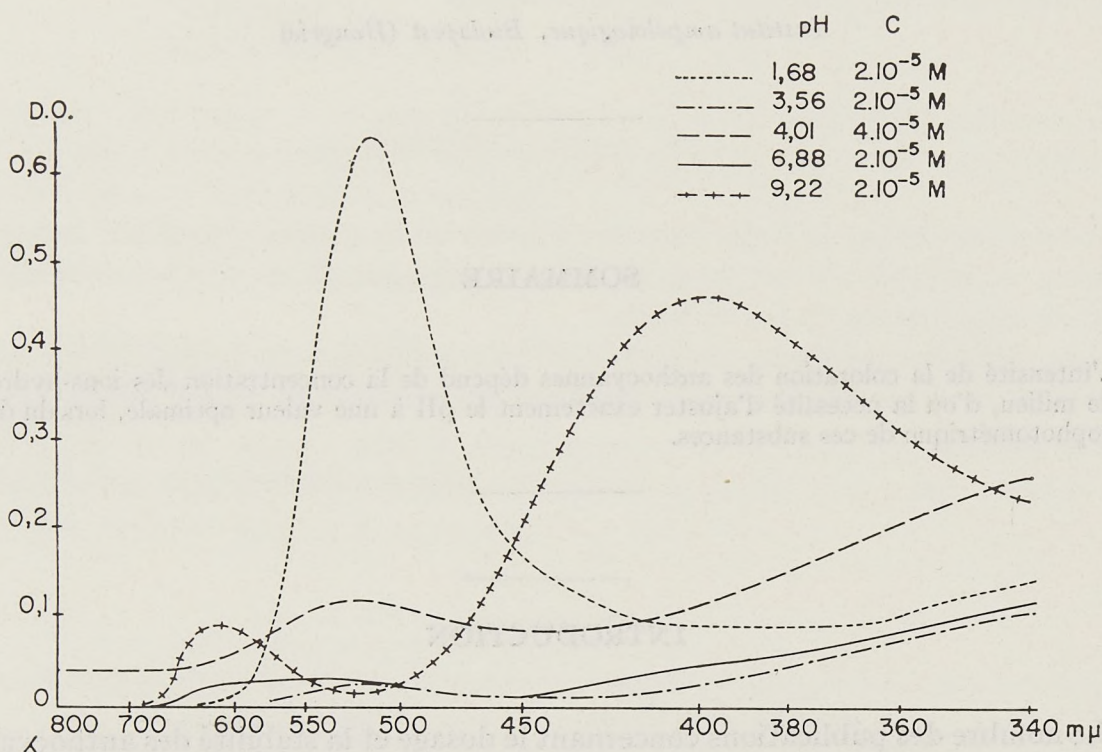


FIG. 1. — Spectres d'absorption dans le visible du malvoside en fonction du pH du milieu

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES ET MATÉRIEL UTILISÉ

Les anthocyanes expérimentées ont été fabriquées par la S^{te} Fluka (Suisse), avec une pureté définie comme « *purum* » et « *practical* ». L'analyse préliminaire du malvoside (DEIBNER, BOURZEIX, 1963), a démontré l'absence d'une contamination significative (moins de 0,5 p. 100).

Les spectres d'absorption dans le visible ont été mesurés à l'aide d'un appareil RPQ 20 de Zeiss, Oberkochen à enregistrement automatique. Les cuves utilisées ont été celles de quartz, avec une épaisseur effective de 0,4 cm. La concentration des solutions employées, est donnée sur les figures 1, 2 et 3.

Les tampons du *National Bureau of Standards (Washington)* (SCHWABE, 1958) ont été utilisés comme solvants au cours de l'établissement des courbes d'absorption ; nous avons retrouvé les valeurs de la littérature avec une erreur de $\pm 0,02$ pH. On a utilisé le pH-mètre Metrohm (Suisse), modèle E 300, à électrodes combinées du type EA 120 X,

Les courbes de sensibilité en fonction du pH ont été déterminées à l'aide d'un spectrophoto-

mètre Jobin-Yvon, cuves de verre (épaisseur 1 cm). Les concentrations employées ont été uniquement de $2,5 \cdot 10^{-5}$ M par litre.

Les courbes de sensibilité ont été tracées avec les tampons de Clark et Lubs (LOISELEUR, 1954), sauf pour les valeurs au-dessous de $\text{pH} = 1$; dans ce cas, au lieu de l'acide chlorhydrique 0,2 N, nous avons ajouté de l'acide chlorhydrique concentré jusqu'à l'obtention du pH désiré. Au cours de cet ajustement le pH-mètre type 22 de la S^{te} Radiometer (Danemark) a été utilisé avec

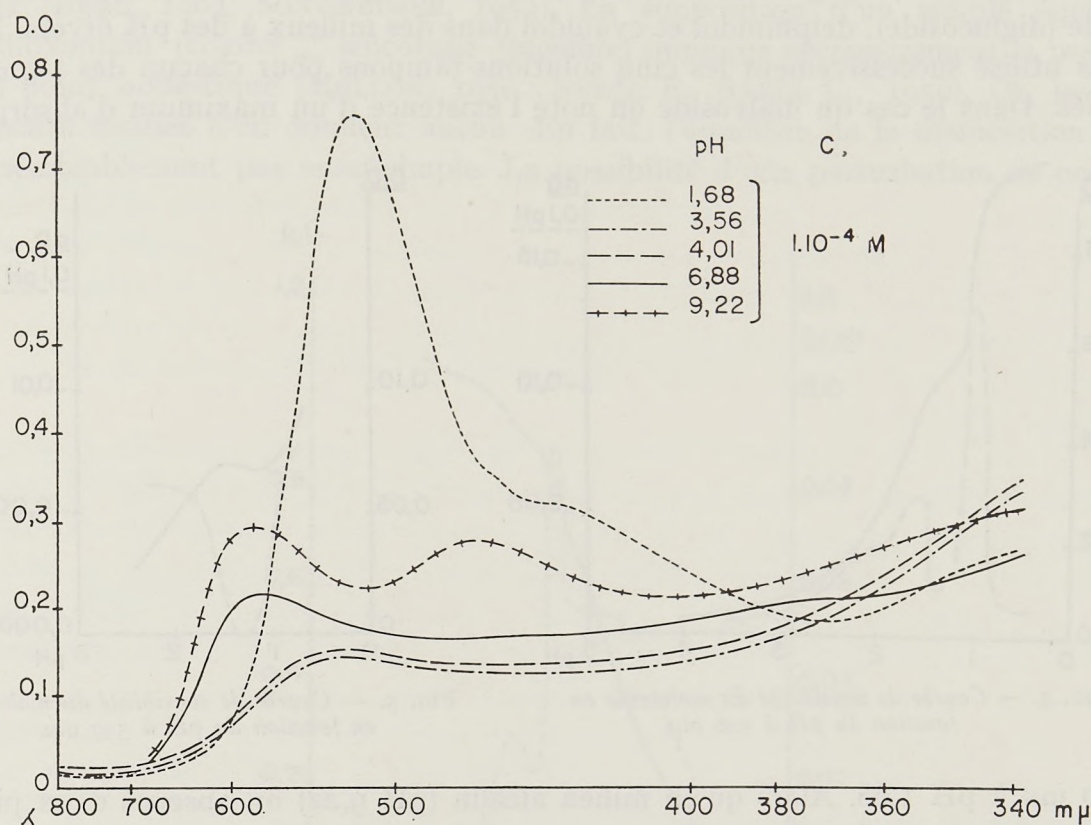


FIG. 2. — Spectres d'absorption dans le visible du delphinidol en fonction du pH

l'électrode Mod. G 202 B du même constructeur. L'un des 5 tampons de NBS, la solution de tétraxalate de potassium 0,05 M (SCHWABE, 1958) a servi comme référence.

Le diglucoside du malvidol était en solution aqueuse, les aglucones ont été dissous dans un milieu contenant 50 p. 100 d'alcool éthylique.

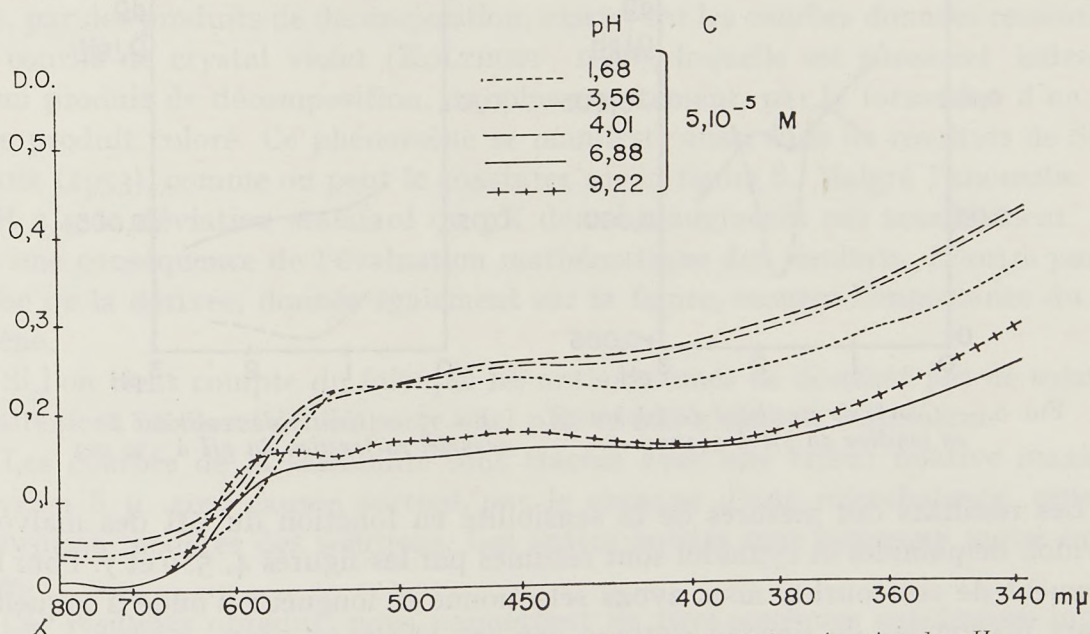


FIG. 3. — Spectres d'absorption dans le visible du cyanidol en fonction du pH

RÉSULTATS

Les figures 1, 2 et 3 donnent les spectres d'absorption dans le visible des malvoside (diglucoside), delphinidol et cyanidol dans des milieux à des pH divers. Nous avons utilisé successivement les cinq solutions-tampons pour chacun des pigments étudiés. Dans le cas du malvoside on note l'existence d'un maximum d'absorption

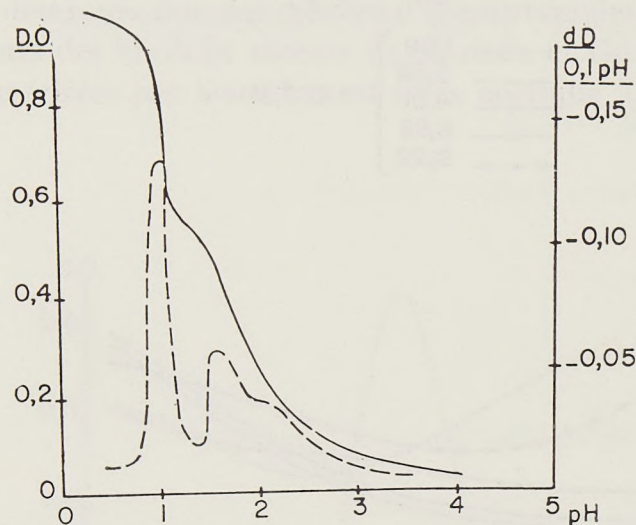


FIG. 4. — Courbe de sensibilité du malvoside en fonction du pH à 520 mμ.

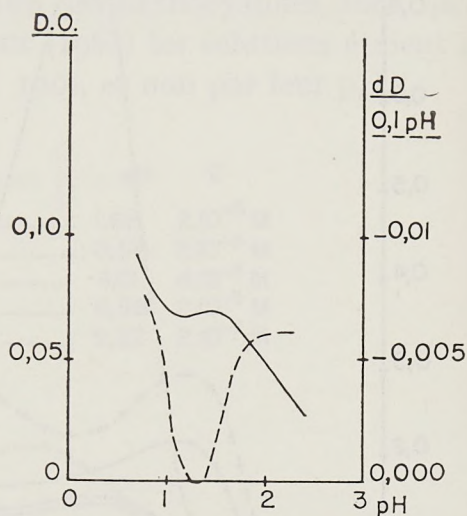


FIG. 5. — Courbe de sensibilité du malvidol en fonction du pH à 540 mμ.

à 520 mμ à pH 1,68. Alors qu'en milieu alcalin (pH 9,22) on observe deux pics à 400 mμ et 615 mμ. Les deux aglucones examinés ont donné des résultats pratiquement identiques.

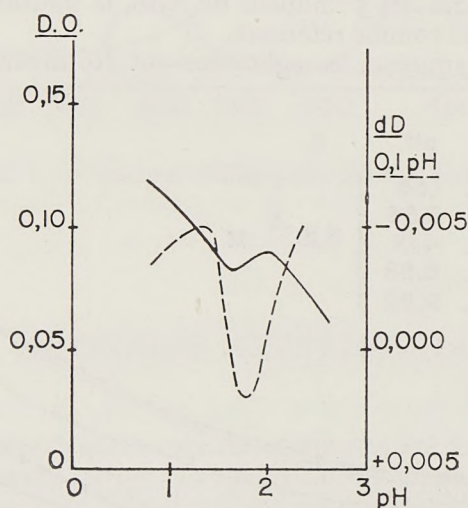


FIG. 6. — Courbe de sensibilité de delphinidol en fonction du pH à 540 mμ.

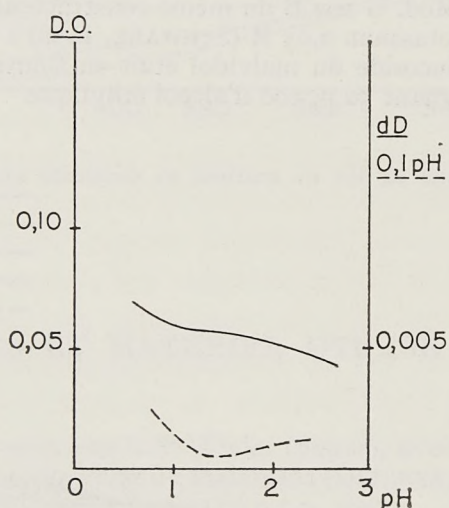


FIG. 7. — Courbe de sensibilité du cyanidol en fonction du pH à 530 mμ.

Les résultats des mesures de la sensibilité en fonction du pH des malvoside, malvidol, delphinidol et cyanidol sont résumés par les figures 4, 5, 6 et 7. Pour l'établissement de ces courbes nous avons sélectionné la longueur d'onde à laquelle les valeurs maximales de densité optique ont été observées. Les courbes pointillées

représentent les valeurs de sensibilité en fonction du pH ($dD/0,1$ pH) exprimées en unités absolues, comme il a été expliqué ci-dessus. Ces valeurs sont transformables en pourcentage en divisant par la valeur de densité optique correspondante.

Les anthocyanes sont considérées actuellement comme des indicateurs normaux (BERG, 1963; SONDHEIMER, 1953). La supposition d'un simple équilibre, sel d'oxonium (coloré) $\rightleftharpoons$ leucobase (incolore) implique nécessairement la présence d'un point isobestique (MELLON, 1950; SNELL F., SNELL C., 1950). Or, les trois pigments étudiés n'en donnent aucun. En fait, l'équilibre de la dissociation n'est vraisemblablement pas aussi simple. La possibilité d'une perturbation de nos me-

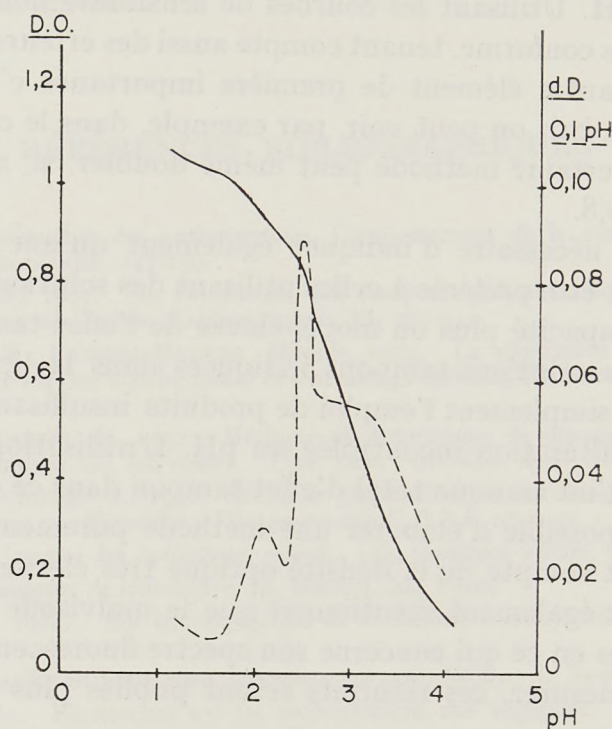


FIG. 8. — Courbe de sensibilité du monoglucoside du pélargonidol (SONDHEIMER, 1953) à 500 m μ .

ures, par des produits de décomposition, existe, car les courbes données ressemblent à la courbe de crystal violet (KOLTHOFF, 1926), laquelle est sûrement influencée par un produit de décomposition, ou, plus exactement, par la formation d'un troisième produit coloré. Ce phénomène se manifeste aussi dans les résultats de SONDHEIMER (1953), comme on peut le constater sur la figure 8. Malgré l'anomalie vers le pH 2,4, la déviation standard du pK donné n'augmente pas sensiblement, mais c'est une conséquence de l'évaluation mathématique des résultats. D'autre part, la courbe de la dérivée, donnée également sur la figure, montre l'importance du phénomène.

Si l'on tient compte du fait que les anthocyanes ne donnent pas de solutions parfaitement incolores à n'importe quel pH, ce fait n'est pas surprenant.

Les courbes de la sensibilité sont tracées avec une erreur relative maximale d'environ 8 p. 100, causée surtout par le manque d'une microbalance, puis par l'absorption modérée des solutions. Les autres erreurs sont beaucoup moins importantes.

Ces résultats obtenus, nous permettent de tirer quelques conclusions intéressantes.

CONCLUSIONS

Au point de vue des méthodes de dosage des anthocyanes, le fait que la sensibilité présente un maximum vers $\text{pH} = 1$, mérite l'attention. En conséquence, en tenant compte des erreurs probables dues à l'ajustement du pH, l'erreur de la détermination finale (c'est-à-dire la mesure de la densité optique) est également maximale pour ce pH. Utilisant les courbes de sensibilité données, on peut choisir une valeur de pH plus conforme, tenant compte aussi des erreurs possibles de la détermination du pH. L'autre élément de première importance c'est la valeur absolue de la densité optique, car, on peut voir, par exemple, dans le cas du malvoside, que la sensibilité d'une certaine méthode peut même doubler, si, au lieu du $\text{pH} = 1,6$, on choisit le $\text{pH} = 0,8$.

Il nous semble nécessaire d'indiquer également qu'une méthode impliquant la mesure du pH doit être préférée à celles utilisant des solutions tampons ou titrées, puisque, malgré la capacité plus ou moins élevée de l'effet tampon des solutions et la valeur du pH des solutions-tampons indiquées dans la littérature, la présence d'autres produits ou simplement l'emploi de produits insuffisamment purs pourront être la cause d'une altération incontrôlée du pH. L'utilisation d'un acide titré est encore pire à cause d'un manque total d'effet tampon dans ce cas.

Il nous semble possible d'élaborer une méthode purement physique de dosage du malvoside, tenant compte de la densité optique très élevée de ce produit en milieu alcalin. On peut également mentionner que le malvisode semble avoir des caractéristiques uniques en ce qui concerne son spectre fluorescent, comme nous avons eu l'occasion de le mesurer, ces résultats seront publiés plus tard.

Reçu pour publication en janvier 1965.

SUMMARY

ON THE PARTICULARITY OF SPECTROPHOTOMETRIC DOSAGE OF ANTHOCYANINS

Spectrophotometric data are given concerning the optical density of some anthocyan solutions, as the function of the pH value. (fig. 1 : malvin ; fig. 2 : delphinidin ; fig. 3 : cyanidin). On this base it is possible :

- 1° to compare results measured at various pH values ;
- 2° to choose proper pH values for the concentration measurements of anthocyanin solutions ;
- 3° the term « pH sensibility » is defined : it is the change of the optical density of the solution after the increase of the pH value by 0,1 pH. (The sign is negative if the optical density decreases when increasing the pH). These values are shown by dotted lines on the fig. 4, 5, 6 and 7, which are the malvin, the malvidin, the delphinidin and the cyanidin respectively, in $2,5 \cdot 10^{-5}$ M/L concentration. The data of SONDHEIMER (1953) concerning the pelargonin are shown on fig. 8.

The existence of a simple equilibrium of oxonium-leucobase of the anthocyanins, as supposed e.g. by SONDHEIMER (1953) and utilised by BERG, (1963), is questioned, because of the lack of any isobestic point.

REMERCIEMENTS

Les travaux ont été effectués en partie dans les laboratoires de la Fondation Zeiss (Oberkochen, Allemagne Fédérale), et ensuite, au cours d'un stage organisé par M. L. de SAINT-RAT sous l'égide de A. S. T. E. F. (Paris), à la Station centrale de Technologie des Produits végétaux de Narbonne, I. N. R. A. (Directeur M. M. FLANZY) au laboratoire de M. L. DEIBNER., auquel l'auteur exprime ses remerciements pour l'aide reçue pendant l'exécution des recherches et la rédaction définitive de ce mémoire. L'auteur est également l'obligé de MM. H. KÄHLER, O. KLING, H. SKOLUDEK, d'une part, et à M. Ch. POUX, d'autre part, pour l'intérêt qu'ils lui ont manifesté et les conseils qu'ils lui ont prodigués au cours des travaux.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BERG H. W., 1963, Stabilisation des anthocyanes. Comportement de la couleur dans les vins rouges. *Ann. Technol. agric.*, n° hors série. 247-259.
- DEIBNER L., BOURZEIX M., 1963. Sur l'extraction des composés polyphénoliques colorés des vins rouges à l'aide de l'acétate de plomb. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 287-312.
- DEIBNER L., BOURZEIX M., CABIBEL-HUGUES Mireille, 1964. La séparation des anthocyanes diglucosides par chromatographie sur une couche mince et leur dosage spectrophotométrique. *Ann. Technol. agric.*, **13**, 359-375.
- DOURMISHIDZÉ S., KHATCHIDZÉ O., 1951. Méthode photométrique de dosage des substances colorantes rouges dans le raisin et dans le vin. (en russe). *Trav. Inst. Vitic. Œn. Acad. Sci., Rép. Soc. Géorgie*. **7**, 208.
- DOURMISCHIDZÉ S., KHATCHIDZÉ O., 1952. Méthode photométrique du dosage des substances colorantes dans le raisin et dans le vin ; *Vinodélie i Vinogradarstvo U.R.S.S.* n° 1, 22.
- KOLTHOFF I. M. 1926. *L'emploi des indicateurs colorés.*, 174, Gauthier-Villars, éd., Paris.
- LOISELEUR J. 1954. *Techniques de laboratoire*, 20, Masson, éd., Paris.
- MARECA J. GONZALEZ A. 1964. Sur la composition de la matière colorante des vins rouges. *Ind. Alim. agric.* **81**, 391-397.
- MELLON M. G. 1950., *Analytical absorption spectroscopy*, 318., Wiley J. New York.
- RIBÉREAU-GAYON P. 1961. Recherches sur les anthocyanes des végétaux. Application au genre *Vitis*. Thèse D. Sc., Paris, *Revue Gén. Bot. Fr.*, 1959, **66**, 531.
- SCHWABE K., 1958. *Fortschritte der pH-Messtechnik.*, 249. Verl. Technik, Berlin,
- SNELL F. D., SNELL C. T. 1950. *Colorimetric methods of analysis*. 161. Van Nostrand, New York,
- SONDHEIMER E., 1953. On the relation between spectral changes and pH of the anthocyanin pelargonidin-3-monoglucoside. *J. amer. Chem. Soc.*, **95**, 1507-1508.
-

NOTE SUR LA TENEUR EN ACIDES AMINÉS DU MOÛT DE RAISIN ET DU VIN EN FONCTION DES CONDITIONS DE L'ANNÉE (MATURATION ET FERMENTATION)

C. FLANZY et Ch. POUX

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

Au cours d'un travail sur les Acides Aminés des Vins (FLANZY C., POUX C., FLANZY M., 1964 a-1964 b), nous avons eu l'occasion de pouvoir comparer la composition en acides aminés d'un moût provenant d'un même cépage, d'une même parcelle durant les deux années consécutives.

Il s'agit du cépage blanc *V. vinifera* « Terret Bourret » cultivé à Pech-Rouge (Gruissan, Narbonne) et des années 1962 et 1963.

Nous nous proposons de répondre aux deux questions suivantes :

1^o Les conditions climatiques de l'année et les conditions de maturation ont-elles une influence sur la composition du raisin en acides aminés ?

2^o Ces moûts ayant été ensemencés par la même souche de levure, la consommation en acides aminés au cours de la fermentation a-t-elle été identique ?

I. — CONDITIONS CLIMATIQUES ET TENEUR EN ACIDES AMINÉS DU MOÛT DE RAISIN

Au point de vue climatique, 1963 a été caractérisé par un manque de chaleur en été (juillet-août) et une grande pluviosité en septembre par rapport à 1962. Les moyennes de températures et la pluviosité des mois de maturation enregistrées sous abri météorologique à proximité de la parcelle où ont été effectués les prélèvements sont données dans le tableau 1.

Les conditions climatiques de 1963, très mauvaises, ont retenti d'une manière assez sensible sur la teneur en sucre et en acides des moûts, ainsi que sur l'N total, comme le montrent les chiffres suivants :

	Sucre (g/l)	acidité totale (g/l SO ₄ H ₂)	N total (mg/l)
	—	—	—
1962.....	195	3,80	196
1963.....	177	5,75	140

Les résultats des teneurs du moût en acides aminés sont donnés individuellement et groupés par familles (selon HARRIS, 1958). (tabl. 2).

Nous voyons que 1963 est globalement moins riche en acides aminés que 1962 de 1/5 environ (3 856 contre 4 774 μ moles). Cependant en 1963 les acides aminés libres du moût sont tous, soit égaux, soit en légère augmentation par rapport à ceux de 1962, à l'exception de la proline et de la thréonine qui, en 1963, sont en diminution très nette. C'est donc à ces acides aminés, et surtout à la proline, qu'est imputable la diminution globale.

TABLEAU I
Les conditions climatiques : températures et pluviométrie pour les mois de « maturation » en 1962 et 1963

	Juillet	Août	Septembre
1962			
Température maxima	27°80	29°40	25°24
Températures minima	16°55	19°00	15°18
Moyenne Max-minim.....	22°17	24°20	20°20
Pluie en mm.....	20,80	traces	29,90
Nombre de jours de pluie.....	4	3	7
Somme des températures moyennes.....	687,8	750,8	606,5
1963			
Température maxima	31°30	24°65	21°00
Température minima	20°10	16°40	14°30
Moyenne Max-minim.....	25°70	20°50	17°60
Pluie en mm.....	8,20	23,90	182,90
Nombre de jours de pluie.....	4	8	13
Somme des températures moyennes.....	797,10	636,60	540,70

Les conditions de maturation d'une année à l'autre peuvent donc influencer notablement sur la composition en acides aminés du moût. Alors que des éléments comme les sucres varient relativement peu, de 10 p. 100 environ, on voit que les teneurs en proline et en thréonine sont modifiées très profondément. Pour la proline, cette teneur en 1963, n'est plus que le quart environ de ce qu'elle était en 1962 et les 2/3 pour la thréonine.

On sait que l'évolution de la proline au cours de la maturation présente des accroissements considérables à certaines périodes de développement comme il a été déjà signalé (S. LAFON-LAFOURCADE, GUIMBERTEAU, 1962). Cet acide aminé serait considéré même par ces auteurs comme la forme principale d'accumulation de l'N rencontré dans le raisin. Nos observations montrent que cette évolution singulière est en plus sous la dépendance des conditions climatiques et surtout thermiques de l'année.

D'un autre côté, le travail de WEISS, ROUSSET et BONNET (1959) mentionne que l'N total des moûts est d'autant plus élevé en Alsace que l'année est plus humide. Cette observation ne se trouve pas vérifiée dans notre cas de vignes méridionales.

II. — CONSOMMATION EN ACIDES AMINÉS AU COURS DE LA FERMENTATION

Les résultats de consommation des acides aminés d'un moût de deux années différentes ensemencé par une même race de levures sont exprimés en pourcentage d'acides aminés consommés par la levure au cours de la fermentation. Ils sont inscrits dans le tableau 3.

Les pourcentages d'acides aminés consommés présentent de larges variations

TABLEAU 2
Acides aminés groupés par familles
(en μ mole/litre)

	Moût	
	1962	1963
Acide glutamique	407	536
Arginine	654	688
Proline	1 876	489
	2 937	1 713
Acide aspartique	57	134
Méthionine	4	24
Thréonine	265	159
Isoleucine	67	110
	393	427
Alanine	347	432
Valine	145	162
Leucine	106	160
	598	754
Sérine	409	570
Glycocolle	93	66
Cystine	3	0
	505	636
Phénylalanine	169	202
Tyrosine	41	25
Tryptophane	19	32
	229	259
Histidine	82	42
Lysine	30	22
Total	4 774	3 856

d'une année à l'autre. C'est ainsi que la consommation de la proline qui est assez souvent relativement faible, de l'ordre de 16 p. 100 en moyenne (levures de brasserie : BARTON-WRIGHT et THORNE, 1949; et levures de vin : FLANZY, POUX, 1964) passe à 100 p. 100 dans la fermentation du moût de 1963. Il semble qu'en milieu pauvre en azote (cas du moût du 1963), la levure arrive à consommer les produits azotés sous leur forme réputée comme la moins assimilable.

TABLEAU 3
*Pourcentage de consommation des acides aminés
pendant la fermentation*

Acides aminés	1962	1963
Acide glutamique	65,0	93,1
Arginine	98,0	99,0
Proline	16,0	100,0
Acide aspartique	47,0	100,0
Méthionine	0	36,0
Thréonine	92,7	95,6
Isoleucine	38,0	93,4
Alanine	87,7	100,0
Valine	72,0	96,3
Leucine	42,0	86,6
Sérine	23,0	65,2
Glycocolle	0	39,5
Cystine	0	0
Phénylalanine	84,0	100,0
Tyrosine	43,0	100,0
Tryptophane	35,0	95,0
Histidine	80,0	74,0
Lysine	0	75,4

Sauf deux acides aminés, l'Arginine et la Thréonine, dont le pourcentage de consommation est très voisin entre les deux années et d'ailleurs très élevé, 1963 est caractérisé par une consommation plus élevée des acides aminés du moût.

On pourrait donc émettre l'hypothèse que la consommation des acides aminés d'un moût dépend non seulement des acides aminés présents dans ce moût et de leurs proportions respectives, mais aussi d'autres composés azotés du milieu.

CONCLUSION

Ces résultats montrent :

1° que le moût de raisin a une composition en acides aminés influencée par les conditions climatiques de l'année ;

2° que le phénomène général de la consommation des acides aminés au cours

de la fermentation est influencé par les conditions de l'année, par suite de la variation de composition que cette dernière imprime aux différents constituants azotés du raisin.

Reçu pour publication en janvier 1965.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARTON WRIGHT, THORNE, 1949. in COOK, A. H.
BARTON WRIGHT, THORNE, 1949. in COOK, A. H. *The Chemistry and Biology of Yeasts*, 284.
HARRIS G., 1958. Nitrogen Metabolism p. 477, in COOK A. H.. *The Chemistry and Biology of Yeasts*. Acad. Press. Inc, Publishers.
LAFON-LAFOURCADE S., GUIMBERTEAU G., 1962. Evolution des amino-acides au cours de la maturation des raisins *Vitis.*, 130-135.
POUX C., FLANZY C., FLANZY M., 1964 *a* Les levures alcooliques dans les vins Protéolyse et Protéogénèse *Ann. Technol. agric.* **13**, 283-300.
FLANZY C., POUX C., FLANZY M., 1964 *b* (à paraître). *Ann. Technol. agric.*
WEISS H., ROUSSET A., BONNET R., 1959. L'évolution des différentes formes d'azote au cours de la fermentation des moûts de raisin provenant de cépages d'Alsace. *C. R. Acad. Sci.*, **249**, 1796.
-

CHRONIQUE DES LIVRES

GAUTIER J. A., KIGER J. G., KIGER J. L. et PELLERIN F. — LES COLORANTS NATURELS ET DE SYNTHÈSE A USAGE PHARMACEUTIQUE ET ALIMENTAIRE. MISES AU POINT DE CHIMIE ANALYTIQUE ORGANIQUE, PHARMACEUTIQUE ET BROMATOLOGIQUE, 13^e série, Paris, Masson et Cie, 1964, 236 p.

Cette treizième série est consacrée, en une monographie d'ensemble, à un seul et important sujet : les colorants alimentaires et pharmaceutiques.

Le « coloriage » des aliments et des médicaments, pratiqué autrefois au moyen d'extraits naturels, s'est considérablement développé avec l'emploi des colorants de synthèse. L'« intensité de couleur » que ces derniers communiquent aux préparations pharmaceutiques ou aux matières alimentaires auxquelles on les incorpore à faible dose, est beaucoup plus importante que celle de la plupart des colorants naturels dont l'emploi est devenu moins fréquent.

Cette étude groupe un ensemble de tests et de techniques permettant à l'analyste de s'assurer de l'identité, de la pureté et de la teneur en colorant par des échantillons commerciaux, de différencier le colorant annoncé de colorants voisins, ou d'identifier chacun des composants dans le cas de mélanges de colorants.

De très nombreux travaux ont été consacrés au problème des colorants et les références rencontrées dans la bibliographie sont d'une très grande diversité. Les auteurs font le point et, en s'appuyant sur les travaux publiés et sur leurs propres recherches, présentent un ensemble des méthodes d'emploi général. Leur ouvrage, très documenté, rendra des services certains aux analystes spécialisés dans l'analyse des médicaments et des aliments.

LEXIQUE DE LA VIGNE ET DU VIN (FRANÇAIS, ITALIANO, ESPAÑOL, DEUTSCH, PORTUGUES, ENGLISH, РУССКИЙ) Paris, Office international de la Vigne et du Vin, 1963, 675 p., 17 planches.

Succédant au lexique en 4 langues paru en 1940, cet ouvrage en 7 langues, a fait appel à la compétence de spécialistes internationaux.

Le nombre de termes contenu dans la première édition a dû être diminué car l'ouvrage aurait alors doublé de volume. Les mots d'usage restreint ou se trouvant dans des dictionnaires généraux ont été abandonnés.

L'ouvrage comporte 4 parties. La première partie, de beaucoup la plus importante, intitulée « Termes et définitions », traite les sujets suivants : généralités, viticulture, œnologie, autres produits dérivés du raisin et du vin, commerce. Chaque terme a l'avantage d'être défini en 7 langues.

La deuxième partie est un index alphabétique en 8 langues, le latin venant s'ajouter aux 7 précédentes pour l'établissement de la liste des termes latins utilisés dans l'ouvrage.

La troisième partie comprend les principales unités de mesures (actuelles et anciennes) et des tableaux de correspondance (températures, densités, degrés alcooliques). Les termes figurant dans cette partie se ne retrouvent pas dans l'index alphabétique.

Enfin l'ouvrage est complété par 17 planches de dessins illustrant certains des termes contenus dans la première partie.

J.L.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — le titre du mémoire : il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — le nom des auteurs, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — le nom des techniciens ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — le nom de l'établissement, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :

a) *sommaire* : résumé suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction*, dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires que pour le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion* ; f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse complète de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds, les dons... ; h) *références bibliographiques*.

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très complet placé en tête de l'article. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (DUPONT et DUVAL, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de : et al. A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) ; le titre du périodique en abrégé selon la World List of Scientific Periodicals, ou le Bulletin Signalétique du C. N. R. S. ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit.

Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée, et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés à l'état de projets, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : soit × 0,5, soit × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des Annales est : 19 × 12,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront deux épreuves à corriger. Les corrections « d'auteur » ne sont autorisées que sur le premier jeu d'épreuves.

Envoi du manuscrit : M. FLANZY, Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude) France, ou M. MOCQUOT, Station centrale de Technologie des Produits animaux, Jouy-en-Josas. Seine-et-Oise). Envoyer deux exemplaires.

Le Directeur-Gérant: M. L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 31-5-1965.

Dépôt légal: 2^e trimestre 1965. N° d'impression: 1552.

**ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE**

VOLUME 14

1965

NUMÉRO 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

149, rue de Grenelle - PARIS-7^e

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

NUMÉRO 2

1962

VOLUME 14

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des
auteurs et de l'Institut national de la Recherche agronomique,
à l'exception des sommaires et résumés.

INFLUENCE DE LA COMPOSITION DE LA RATION ALIMENTAIRE SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DU BEURRE DE VACHE ⁽¹⁾

PREMIÈRE PARTIE ⁽²⁾

Simonne KUZDZAL-SAVOIE

*Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux.
Centre national de Recherches zootechniques. Jouy-en-Josas. (Seine-et-Oise)*

SOMMAIRE

CONSTITUTION EN ACIDES GRAS DU BEURRE SELON LES CONDITIONS D'ALIMENTATION SAISONNIÈRES DE LA VACHE

INTRODUCTION.

Influence de la mise au pâturage des vaches laitières sur la constitution en acides gras du beurre.

I. — Variations des acides polyinsaturés pendant la période de mise au pâturage.

II. — Variations des acides majeurs au cours de la période de mise au pâturage des vaches laitières.

Variations des acides polyinsaturés du beurre au cours de l'année.

Étude des variations de l'acide vaccénique en fonction du régime alimentaire des vaches laitières, pendant les périodes de pâturage et de stabulation.

LA RÉPERCUSSION DE LA CONSTITUTION DES LIPIDES ALIMENTAIRES SUR LES LIPIDES DU BEURRE

INTRODUCTION.

Les acides gras de la Luzerne (*Medicago sativa*).

Constitution des lipides de l'herbe de pâturage. Répercussion de cette constitution sur celle des lipides du lait.

(1) Ce travail a fait l'objet d'une thèse de Doctorat ès Sciences naturelles, soutenue le 20 avril 1964 à la Faculté des Sciences de l'Université de Paris.

(2) La deuxième partie de ce mémoire paraîtra dans le n° 3/1965 des Annales de Technologie agricole.

Introduction de tourteaux ou de concentrés dans le régime. Constitution de leurs lipides.
Répercussion sur ceux du beurre.

ÉTUDE QUANTITATIVE DES ACIDES GRAS INGÉRÉS ET DES ACIDES GRAS PRÉSENTS DANS LE LAIT.
CONCLUSIONS.

ANNEXE.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.

CONSTITUTION EN ACIDES GRAS DU BEURRE SELON LES CONDITIONS D'ALIMENTATION SAISONNIÈRES DE LA VACHE

CONSTITUTION EN ACIDES GRAS DU BEURRE

SELON LES CONDITIONS D'ALIMENTATION SAISONNIÈRES

DE LA VACHE

INTRODUCTION

Les études relatives aux variations des acides polyinsaturés du beurre en fonction des conditions d'alimentation saisonnières des vaches laitières (MATTSSON *et al.* (73), 1951 ; McDOWELL (23), 1953 ; STADHOUDERS et MULDER (102), 1955 ; SWARTLING et MATTSSON (104), 1956 ; REINART et NESBITT (82), 1956 ; JENSEN *et al.* (53) 1958 ; RIEL (85), 1963) sont plus nombreuses que celles se rapportant aux variations de l'ensemble des acides gras (STADHOUDERS et MULDER (103), 1956 ; HANSEN et SHORLAND (38), 1952). Ceci peut être dû aux difficultés analytiques présentées par la séparation des acides majeurs ⁽¹⁾ du beurre, avant l'application généralisée de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

Il est intéressant de remarquer que les variations observées sont de faible amplitude dans les pays où les vaches séjournent l'année entière au pâturage (Nouvelle-Zélande), et sont au contraire accentuées dans les pays où existe l'alternance d'une période de pâturage et d'une période de stabulation. En Hollande par exemple (STADHOUDERS et MULDER (102) (103), 1955 et 1956) la mise au pâturage et la rentrée à l'étable des vaches laitières entraînent des modifications brusques dans la constitution en acides gras du beurre.

En France, les conditions de vie du cheptel bovin sont assez semblables à celles rencontrées en Hollande, mais présentent cependant une plus grande diversité, due à la diversité même des zones climatiques.

Dans un premier chapitre nous étudions en détail les variations de la constitution en acides gras du beurre (acides polyinsaturés et acides majeurs) à l'époque précise de la mise au pâturage, c'est-à-dire pendant les deux ou trois semaines qui encadrent le jour de sortie au pâturage.

En analysant la graisse du lait jour après jour et même traite après traite, il devrait être en outre possible de déterminer un temps de réponse aux variations du régime alimentaire (temps s'écoulant entre une variation du régime et une modification des proportions relatives des acides gras du lait) et de préciser les variations journalières de composition de la graisse du lait.

L'étude des acides polyinsaturés du beurre est poursuivie pendant une année entière. Ceci en vue de préciser certains aspects du problème de leur origine dans la graisse du lait. Ce développement fait l'objet du 2^e chapitre.

Enfin le troisième chapitre est consacré à l'étude des variations du taux d'acide vaccénique dans le beurre en fonction des modifications saisonnières du régime alimentaire. La présence de cet acide dans le beurre constitue un phénomène caractéristique et toute nouvelle information permettant de préciser son origine, encore mal établie, présente un intérêt.

⁽¹⁾ Nous appelons acides majeurs du beurre, les acides gras dont le taux peut atteindre ou dépasser 10 p. 100 des acides totaux. Ce sont, parmi les acides saturés, les acides myristique (14 : 0), palmitique (16 : 0) et stéarique (18 : 0) et, parmi les acides insaturés, l'acide oléique (18 : 1).

NOTE

Dans le texte nous appelons « *herbe* », la végétation d'une prairie, constituée généralement par différentes familles de plantes parmi lesquelles les graminées et les légumineuses sont prépondérantes.

Le « *fouillage* » est un aliment « vert » distribué aux vaches laitières. Il est constitué par diverses espèces de graminées ou de légumineuses.

Dans le texte le mot « *fouillage* » est utilisé lorsqu'il s'agit d'une espèce botanique déterminée.

Le « *foin* » est de l'herbe de prairie ou du fouillage séché par exposition à l'air et au soleil. Cet aliment est distribué l'hiver aux vaches laitières.

L'« *ensilage* » est constitué par de l'herbe ou du fouillage conservé. L'herbe ou le fouillage sont généralement fauchés à un stade précoce de végétation, puis découpés en fragments qui sont ensuite entassés. Cette masse est souvent acidifiée. Une fermentation lactique se développe ensuite et protège la masse d'herbe ou de fouillage de la putréfaction.

CHAPITRE I

**INFLUENCE DE LA PÉRIODE DE MISE AU PATURAGE
DES VACHES LAITIÈRES SUR LA CONSTITUTION
EN ACIDES GRAS DU BEURRE**

Cette période d'environ deux semaines constitue un exemple « naturel » d'un bouleversement complet de la ration alimentaire des vaches laitières. Soumises pendant près de six mois à un régime composé de foin, d'ensilage et de betteraves avec le plus souvent une distribution supplémentaire de concentré (généralement à base de céréales), les vaches laitières sont ensuite nourries exclusivement avec de l'herbe de pâture. Nous savons déjà que la composition des acides gras du beurre varie alors très fortement. Nous présenterons maintenant ces modifications, jour après jour, et le plus souvent traite après traite. Nous distinguerons cependant l'étude poursuivie pendant les printemps 1958 et 1959, relative aux variations des acides polyinsaturés (I) de l'étude poursuivie au printemps 1960, qui se rapporte plus spécialement aux variations des acides majeurs (II).

**I. — Variations des acides polyinsaturés
pendant la période de mise au pâturage**

Si l'on extrait des études portant sur les variations saisonnières des acides polyinsaturés du beurre, dans les pays européens, les observations relatives à la période de printemps où intervient précisément le changement du régime alimentaire (passage de la stabulation à la vie au pâturage) on constate que la mise au régime herbacé des vaches laitières, entraîne une augmentation nette du taux de l'acide diène conjugué, une augmentation légère du taux de l'acide triène non conjugué (acide linoléique) et des résultats variables en ce qui concerne l'acide diène non conjugué (acide linoléique). STADHOUDERS et MULDER (102) (1955), observent une nette diminution entre fin mars et mai, suivie aussitôt d'une légère augmentation. Inversement, JENSEN, PEDERSEN et OVERGAARD (53) (1958), notent d'avril à juin, une augmentation suivie d'une diminution. Enfin, SWARTLING et MATTSSON (104) (1956), relèvent peu de variation du taux de l'acide linoléique entre avril et mai, mais signalent en juin des valeurs faibles (0,2 g pour 100 g de matière grasse).

Compte tenu des résultats précédents, il nous a semblé utile d'étudier les acides polyinsaturés du beurre fabriqué à partir du lait de mélange produit chaque jour

par les vaches laitières appartenant à un même troupeau et soumises à des conditions de vie identiques, et ceci, pendant une période d'environ deux semaines encadrant la mise à l'herbe des vaches laitières.

Nous grouperons deux études effectuées l'une en 1958 et l'autre en 1959, identiques quant à leur objectif mais présentant des modalités d'expérimentation différentes.

A. — MATÉRIEL, ET MÉTHODES

1) Modalité de la mise au pâturage

Ces modalités sont décrites sur la figure 1. En 1958 les 40 vaches du troupeau furent mises au pâturage le 24 avril. Elles rentrèrent cependant à l'étable la nuit pendant les trois jours suivants et y reçurent du foin et de l'ensilage. La consommation de ces aliments, notable le lendemain de la mise à l'herbe fut pratiquement nulle les 2 jours suivants.

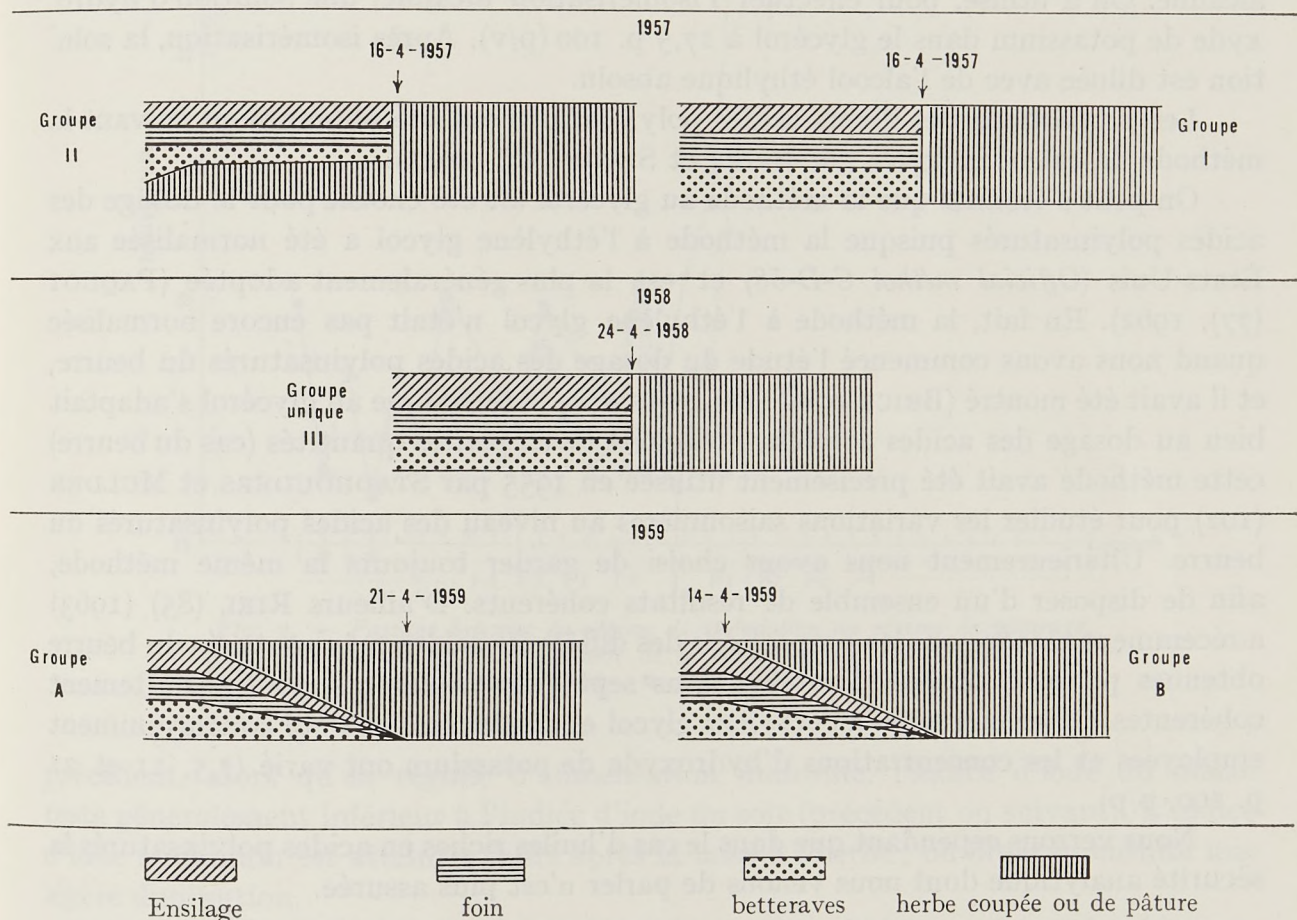


FIG. 1. — Modalités de la mise à l'herbe : la flèche indique la sortie au pâturage

En 1957 des conditions voisines de changement de régime s'étaient présentées pour un groupe de 7 vaches. Nous y ferons allusion au cours de l'étude. On peut ainsi estimer qu'il s'est agi dans ces deux cas d'un passage brusque du régime de stabulation au régime de pâturage.

En 1959 par contre, les modalités de la mise à l'herbe furent différentes. Les vaches laitières passèrent progressivement du régime de stabulation au régime de pâturage.

2) Déterminations analytiques

On prépare des échantillons pondérés de lait de mélange, correspondant aux divers groupes de vaches laitières et représentatifs de chaque traite. Après écrémage du lait, la crème est transformée en beurre, au moyen d'un « mixer ».

Le beurre est fondu au bain-marie à 70°C et centrifugé. L'analyse est effectuée sur la matière grasse surnageante ; elle comporte la détermination de l'indice d'iode et le dosage des acides polyinsaturés.

On a déterminé l'indice d'iode selon la méthode de WIJS.

Les acides polyinsaturés ont été dosés par spectrophotométrie dans l'ultra-violet suivant la méthode décrite par BRICE et SWAIN (10) (1945). Le dosage des acides polyinsaturés comportant des doubles liaisons en position conjuguée est effectué sur la matière grasse dissoute dans le cyclohexane. Les acides polyinsaturés comportant des doubles liaisons en position non conjuguée sont dosés après isomérisation alcaline. On a utilisé, pour effectuer l'isomérisation alcaline, une solution d'hydroxyde de potassium dans le glycérol à 17,5 p. 100 (p/v). Après isomérisation, la solution est diluée avec de l'alcool éthylique absolu.

Les proportions des divers acides polyinsaturés ont été obtenues en suivant la méthode de calcul indiquée par BRICE et SWAIN (10) (1945).

On peut s'étonner que la méthode au glycérol ait été choisie pour le dosage des acides polyinsaturés puisque la méthode à l'éthylène glycol a été normalisée aux États-Unis (*Official method C-D-58*) et est la plus généralement adoptée (PAQUOT (77), 1962). En fait, la méthode à l'éthylène glycol n'était pas encore normalisée quand nous avons commencé l'étude du dosage des acides polyinsaturés du beurre, et il avait été montré (BRICE et al. (11), 1952) que la technique au glycérol s'adaptait bien au dosage des acides polyinsaturés présents en petites quantités (cas du beurre) cette méthode avait été précisément utilisée en 1955 par STADHOUDERS et MULDER (102) pour étudier les variations saisonnières au niveau des acides polyinsaturés du beurre. Ultérieurement nous avons choisi de garder toujours la même méthode, afin de disposer d'un ensemble de résultats cohérents. D'ailleurs RIEL (85) (1963) a récemment montré que les proportions des différents acides polyinsaturés du beurre obtenues par une dizaine d'auteurs dans sept pays différents, sont parfaitement cohérentes. Or les méthodes à l'éthylène glycol et au glycérol ont été concurremment employées et les concentrations d'hydroxyde de potassium ont varié (7,5, 11 et 21 p. 100, p/p).

Nous verrons cependant que dans le cas d'huiles riches en acides polyinsaturés la sécurité analytique dont nous venons de parler n'est plus assurée.

B. — RÉSULTATS

1) Variation de l'indice d'iode

Les résultats obtenus au cours de l'expérimentation poursuivie en 1958 sont portés sur la figure 2. On y a adjoint des résultats obtenus en 1957 à partir d'un groupe de vaches soumises à des conditions très semblables à celles de l'expérience de 1958.

Dans le cas d'un passage brusque du régime de stabulation au régime de pâturage, l'indice d'iode de la matière grasse du beurre augmente rapidement.

Ainsi la mise à l'herbe ayant eu lieu le jour J, à 15 heures, l'augmentation est déjà notable moins de 16 heures après la sortie des vaches. Cette augmentation s'amplifie au cours des jours suivants, et en 48 heures (du soir du jour J au soir du jour J + 2), l'indice d'iode augmente de 12 unités en 1957 et de 11,5 unités en 1958. Pendant ces 48 heures l'indice d'iode du matin est supérieur puis égal à l'indice d'iode du soir

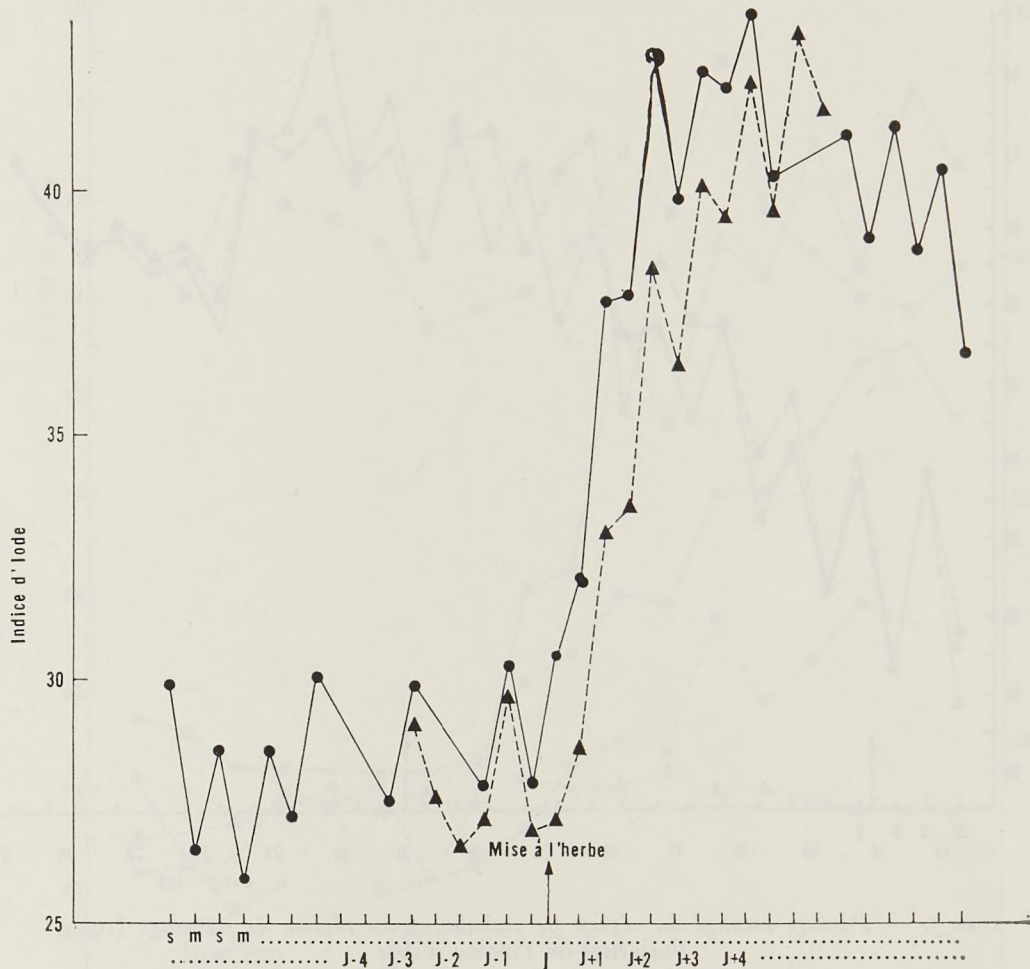


FIG. 2. — Passage brusque du régime de stabulation au régime de pâturage
Variation de l'indice d'iode de la matière grasse du beurre
1957 (groupe 1) ●—● 1958 ▲---▲

précédent, alors qu'en régime d'alimentation uniforme, l'indice d'iode du matin reste généralement inférieur à l'indice d'iode du soir (précédent ou suivant). L'indice d'iode maximum est atteint 4 jours après la mise à l'herbe ; on observe ensuite une légère diminution.

Dans le cas d'un passage ménagé du régime de stabulation au régime de pâturage, la variation de l'indice d'iode de la matière grasse du lait se présente différemment. La figure 3 montre l'évolution de l'indice d'iode correspondant aux troupeaux A et B (1959). A partir du jour où l'herbe fraîche est introduite dans l'alimentation des vaches laitières, on assiste à une augmentation progressive de l'indice d'iode, augmentation en quelque sorte « contenue ». En effet d'une part l'indice d'iode du matin reste généralement (et même toujours pour le groupe A) inférieur à l'indice d'iode du

soir précédent comme cela semble être de règle en régime stable et, d'autre part, l'indice d'iode le plus élevé est atteint 24 heures après l'établissement du régime de pâturage complet, alors qu'il était atteint seulement le 4^e jour dans le cas du changement brusque de régime alimentaire.

L'amplitude totale de variation de l'indice d'iode (calculée d'un matin à un autre) est de 13 unités en moyenne. En fait, du 13 au 23 avril 1959 l'augmentation de l'indice d'iode pour le groupe B sorti au pâturage dès le 14 avril dépasse de 3 unités l'augmen-

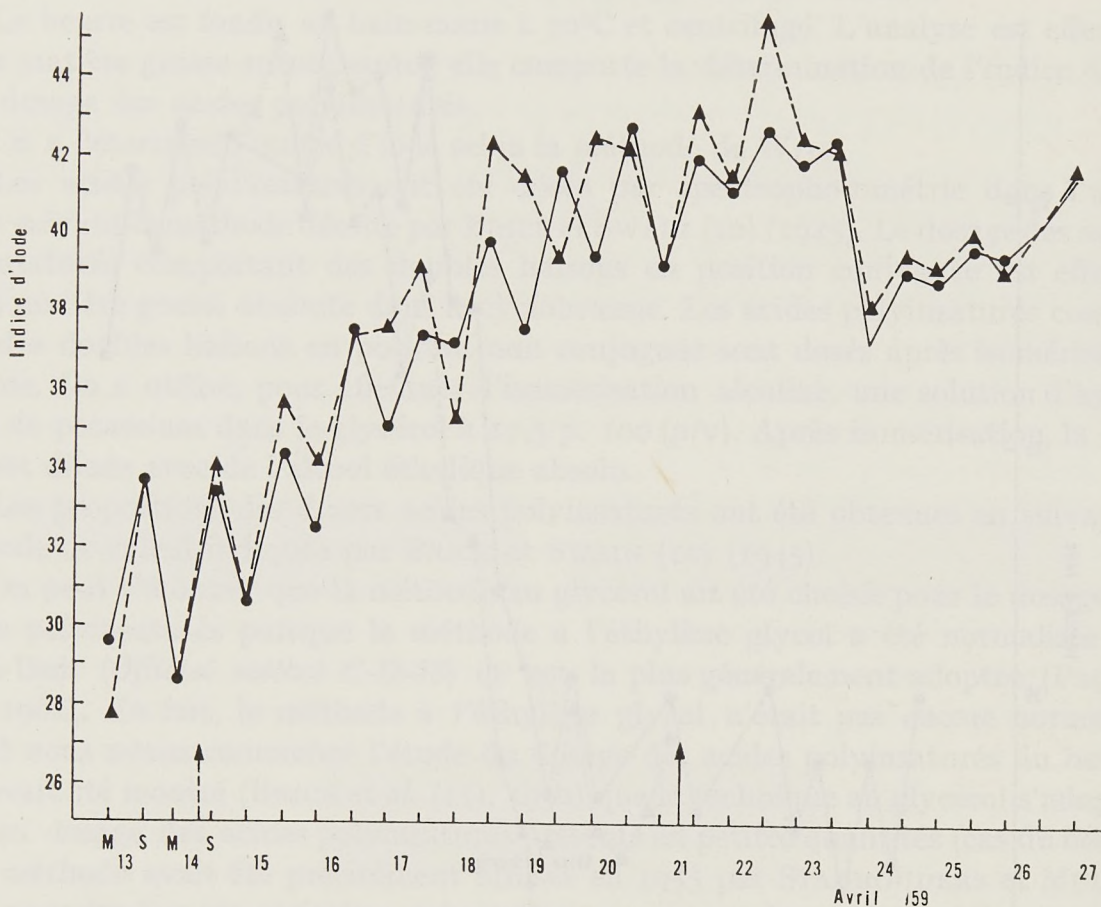


FIG. 3. — Passage ménagé du régime de stabulation au régime de pâturage (1959)
Variation de l'indice d'iode
troupeau A (●—●) troupeau B (▲---▲)

tation de l'indice d'iode se rapportant au groupe A sorti seulement le 21 avril. L'environnement « plein air » semble ainsi avoir amplifié l'influence spécifique de l'alimentation à l'herbe.

2) Variations des acides polyinsaturés

La méthode utilisée permet de connaître les taux respectifs des acides diènes triènes et tétraènes conjugués ou non conjugués. Au dernier groupe appartiennent les acides linoléique (diène) linolénique (triène) et arachidonique (tétraène). Les teneurs du beurre en triènes et tétraènes conjugués sont trop faibles pour qu'une variation saisonnière soit valablement recherchée.

Nous distinguerons à nouveau les changements observés pendant la période de mise au pâturage lorsque celle-ci est brusque et lorsqu'elle est progressive.

Lorsqu'elle est brusque (1958) on observe les variations portées dans le tableau 2 et sur la figure 4. Corrélativement à l'augmentation de l'indice d'iode, le taux des diènes conjugués s'élève (la proportion trouvée le 29 avril est approximativement triple de la proportion trouvée le 21 avril). Avec une amplitude moindre le taux des triènes non conjugués (acide linoléinique) s'élève également. Par contre les taux des

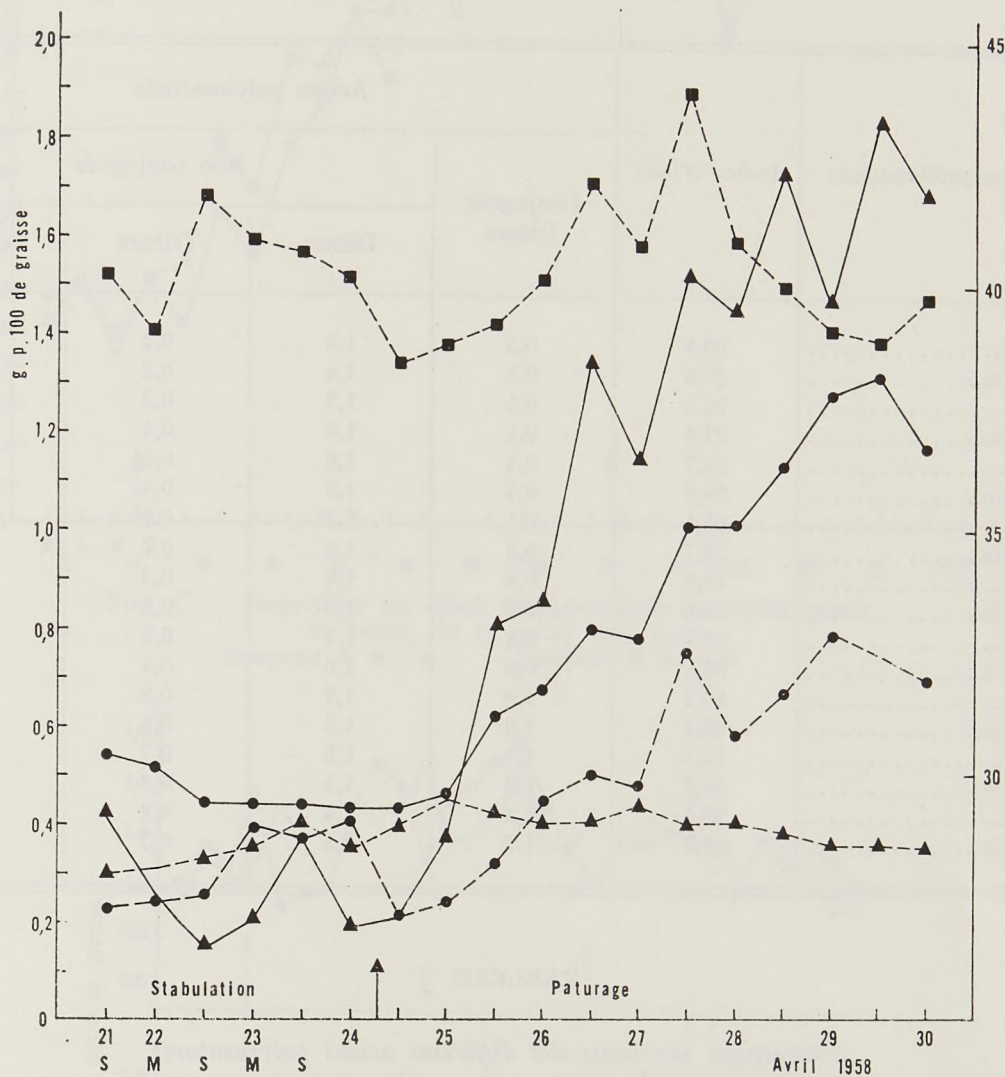


FIG. 4. — *Passage brusque du régime de stabulation au régime de pâturage*
Variation de l'indice d'iode (▲—▲) et des proportions de diènes conjugués (●—●),
de diènes (■—■), triènes (●---●) et tétraènes (▲---▲)
non conjugués de la matière grasse du beurre

diènes et tétraènes non conjugués sont relativement stables. On observe approximativement les mêmes valeurs au début et à la fin de l'expérimentation. On note cependant une augmentation temporaire du taux des diènes non conjugués.

Le tableau 3 montre clairement les changements du taux des différents acides polyinsaturés, entre la période précédant et la période suivant la mise au pâturage.

Lorsque la transition entre les régimes de stabulation et de pâturage est progressive (1959), les variations au niveau des acides polyinsaturés sont quelque peu différentes.

Les résultats des analyses effectuées sur les échantillons de 1959, sont portés

TAB. 2

Passage brusque du régime de stabulation au régime de pâturage
(Mise à l'herbe : 24 avril 1958).

Variations de l'indice d'iode et des proportions des acides polyinsaturés de la matière grasse du lait
(en g pour 100 g de matière grasse)

Date des prélèvements	Indice d'iode	Acides polyinsaturés			
		Conjugués Diènes	Non conjugués		
			Diènes	Triènes	Tétraènes
21-4 soir.....	29,1	0,5	1,5	0,2	0,3
22-4 matin.....	27,6	0,5	1,4	0,2	0,3
22-4 soir.....	26,5	0,4	1,7	0,3	0,3
23-4 matin.....	27,1	0,4	1,6	0,4	0,4
23-4 soir.....	28,7	0,4	1,6	0,4	0,4
24-4 matin.....	26,9	0,4	1,5	0,4	0,4
24-4 soir.....	27,1	0,4	1,3	0,2	0,4
25-4 matin.....	28,7	0,5	1,4	0,2	0,5
25-4 soir.....	33,0	0,6	1,4	0,3	0,4
26-4 matin.....	33,6	0,7	1,5	0,5	0,4
26-4 soir.....	38,4	0,8	1,7	0,5	0,4
27-4 matin.....	36,4	0,8	1,6	0,5	0,4
27-4 soir.....	40,3	1,0	1,9	0,8	0,4
28-4 matin.....	39,5	1,0	1,6	0,6	0,4
28-4 soir.....	42,4	1,1	1,5	0,7	0,4
29-4 matin.....	39,7	1,3	1,4	0,8	0,4
29-4 soir.....	43,5	1,3	1,4	0,8	0,4
30-4 matin.....	41,8	1,2	1,5	0,7	0,4

TAB. 3

Proportions moyennes des différents acides polyinsaturés
(en g pour 100 g de matière grasse)

	Du 21 au 25 avril	Du 25 au 30 avril
Diènes conjugués	0,46	0,98
Acide linoléique	1,49	1,55
Acide linolénique	0,29	0,60
Acide arachidonique	0,37	0,39

dans les tableaux 4 et 5 et sur les figures 5 et 6. Les variations des diènes conjugués d'une part et des diènes, triènes et tétraènes, non conjugués d'autre part, sont indiquées.

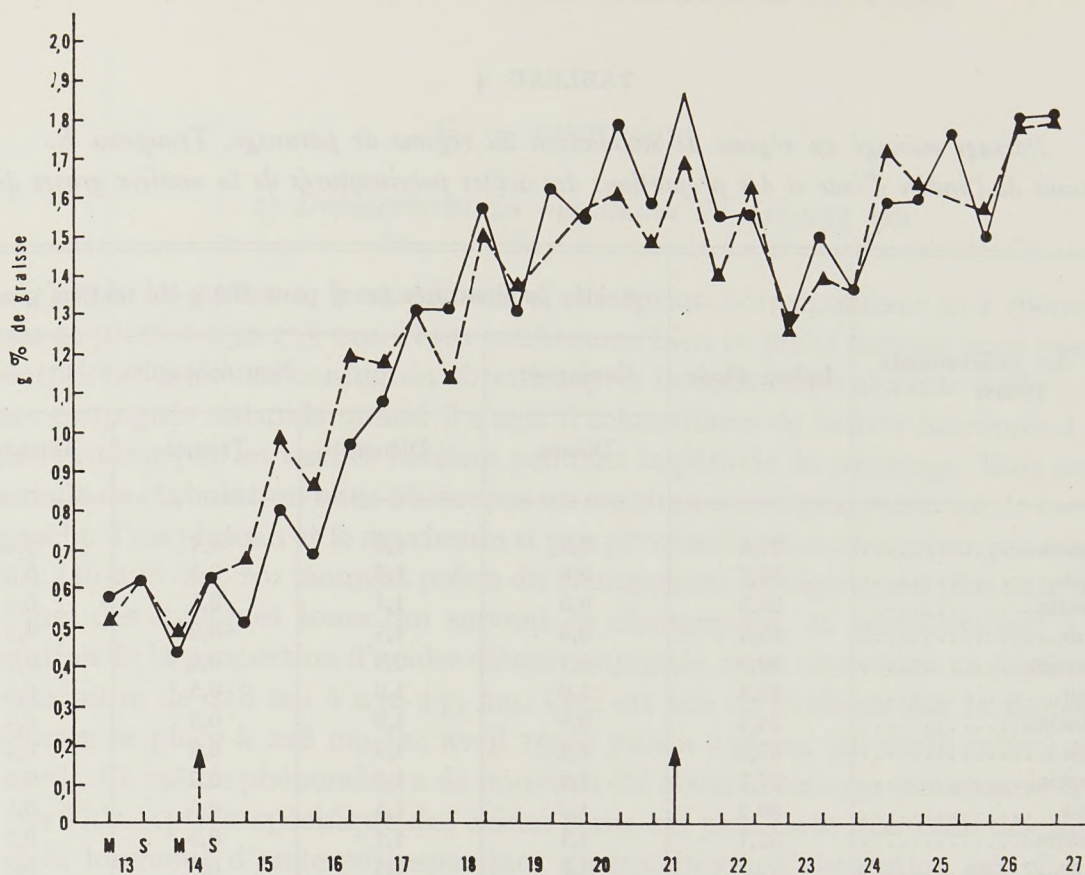


FIG. 5. — Proportions des diènes conjugués dans la matière grasse du beurre, du 13 au 27 avril 1959
troupeau A ●—● troupeau B ▲---▲

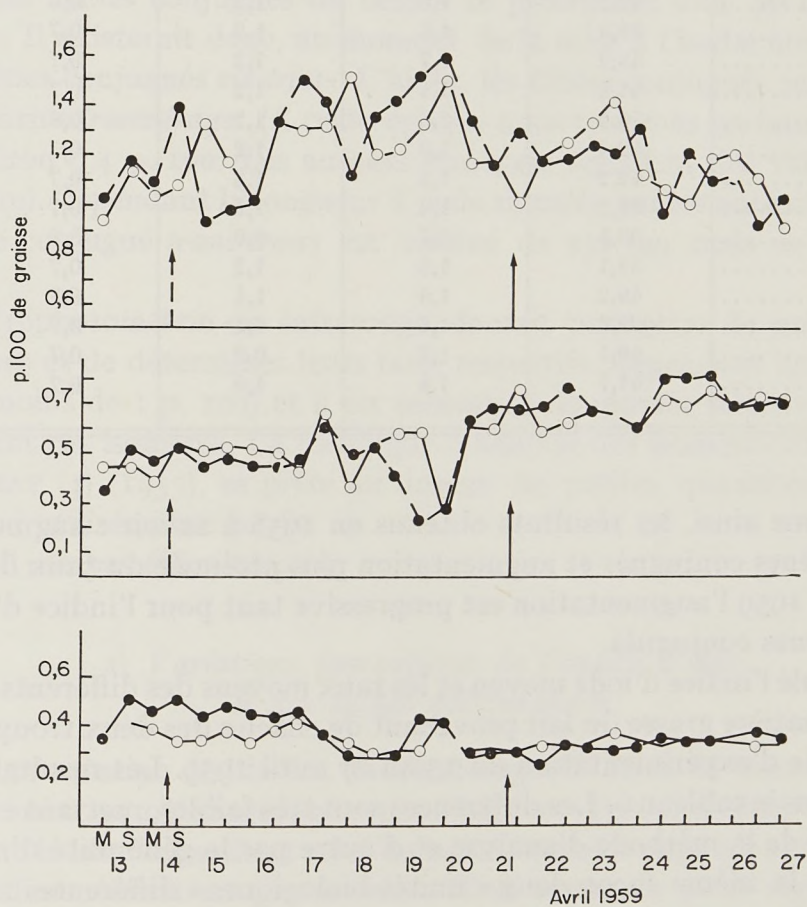


FIG. 6. — Variation des proportions de diènes (graphique supérieur), triènes (graphique central) et tétraènes (graphique inférieur) non conjugués, dans la matière grasse du beurre, du 13 au 27 avril 1959
○—○ troupeau A ●---● troupeau B

TABLEAU 4

Passage ménagé du régime de stabulation au régime de pâturage. Troupeau B.
Variations de l'indice d'iode et des proportions des acides polyinsaturés de la matière grasse du lait

Date des prélèvements (1959)	Indice d'iode	Acides polyinsaturés (en g pour 100 g de matière grasse)			
		Conjugués	Non conjugués		
			Diènes	Triènes	Tétraènes
13-4 matin.....	27,6	0,5	1,0	0,4	0,4
13-4 soir.....	33,7	0,6	1,2	0,5	0,4
14-4 matin.....	28,5	0,5	1,1	0,5	0,4
14-4 soir.....	34,4	0,6	1,4	0,5	0,3
15-4 matin.....	30,9	0,7	0,9	0,4	0,4
15-4 soir.....	35,8	1,0	1,0	0,5	0,4
16-4 matin.....	34,4	0,9	1,0	0,5	0,4
16-4 soir.....	37,5	1,2	1,3	0,4	0,4
17-4 matin.....	37,7	1,2	1,5	0,5	0,4
17-4 soir.....	39,2	1,3	1,4	0,6	0,4
18-4 matin.....	35,1	1,1	1,1	0,5	0,3
18-4 soir.....	42,3	1,5	1,4	0,5	0,3
19-4 matin.....	41,3	1,4	1,4	0,4	0,3
19-4 soir.....	39,3	1,5	1,5	0,2	0,4
20-4 matin.....	42,5	1,6	1,6	0,3	0,4
20-4 soir.....	42,2	1,6	1,3	0,6	0,3
21-4 matin.....	39,3	1,5	1,2	0,7	0,3
21-4 soir.....	43,2	1,7	1,3	0,7	0,3
22-4 matin.....	41,4	1,4	1,2	0,7	0,2
22-4 soir.....	45,5	1,6	1,2	0,8	0,3
23-4 matin.....	42,4	1,3	1,2	0,7	0,3
23-4 soir.....	42,2	1,4	1,2	0,7	0,3
24-4 matin.....	38,2	1,4	1,3	0,7	0,3
24-4 soir.....	39,5	1,7	1,0	0,8	0,4
25-4 matin.....	39,1	1,6	1,2	0,7	0,3
25-4 soir.....	40,2	1,6	1,1	0,7	0,3
26-4 matin.....	39,0	1,6	1,1	0,7	0,4
26-4 soir.....	40,4	1,8	0,9	0,7	0,4
27-4 matin.....	41,7	1,8	1,0	0,7	0,4

On confirme ainsi, les résultats obtenus en 1958 à savoir : augmentation nette du taux des diènes conjugués et augmentation plus atténuée du taux des triènes non conjugués. En 1959 l'augmentation est progressive tant pour l'indice d'iode que pour le taux des diènes conjugués.

On a calculé l'indice d'iode moyen et les taux moyens des différents acides polyinsaturés de la matière grasse du lait provenant de chacun des deux troupeaux pendant toute la période d'expérimentation du 13 au 27 avril 1959. Les résultats de ce calcul sont portés dans le tableau 6. Les différences sont très faibles, mettant en valeur d'une part la fidélité de la méthode d'analyse et d'autre par le généralité d'un phénomène atteignant de la même façon deux « unités biologiques » différentes : le troupeau A et le troupeau B.

C. — DISCUSSION

1) *Déplacement du maximum de 228-233 m μ*

D'après les auteurs, le maximum d'absorption correspondant aux diènes conjugués se place à 232-233 m μ . Nous confirmons bien ce point lorsque nous mesurons l'absorption des diènes conjugués obtenus après isomérisation alcaline à 180°, ou des diènes conjugués naturels quand il s'agit d'échantillons de beurre fabriqués à partir du lait produit par les vaches laitières pendant la période de pâturage. Mais pendant la période de stabulation nous observons un maximum très peu prononcé, la courbe se rapproche d'un plateau et le maximum si peu prononcé soit-il ne se place pas à 232 m μ mais à 226-228 m μ . Au moment précis du changement de régime, ou plus exactement au cours des quelques jours qui suivent ce changement, et parallèlement à l'augmentation de la proportion d'acides diènes conjugués, nous observons un déplacement du maximum de 228 m μ à 232-233 m μ . Ceci est mis en évidence sur la figure 7 : le maximum se place à 228 m μ (24 avril 1958) puis à 230 m μ (26 avril) enfin à 232 m μ (27 avril). Ce même phénomène a de nouveau été observé en 1959 (troupeaux A et B).

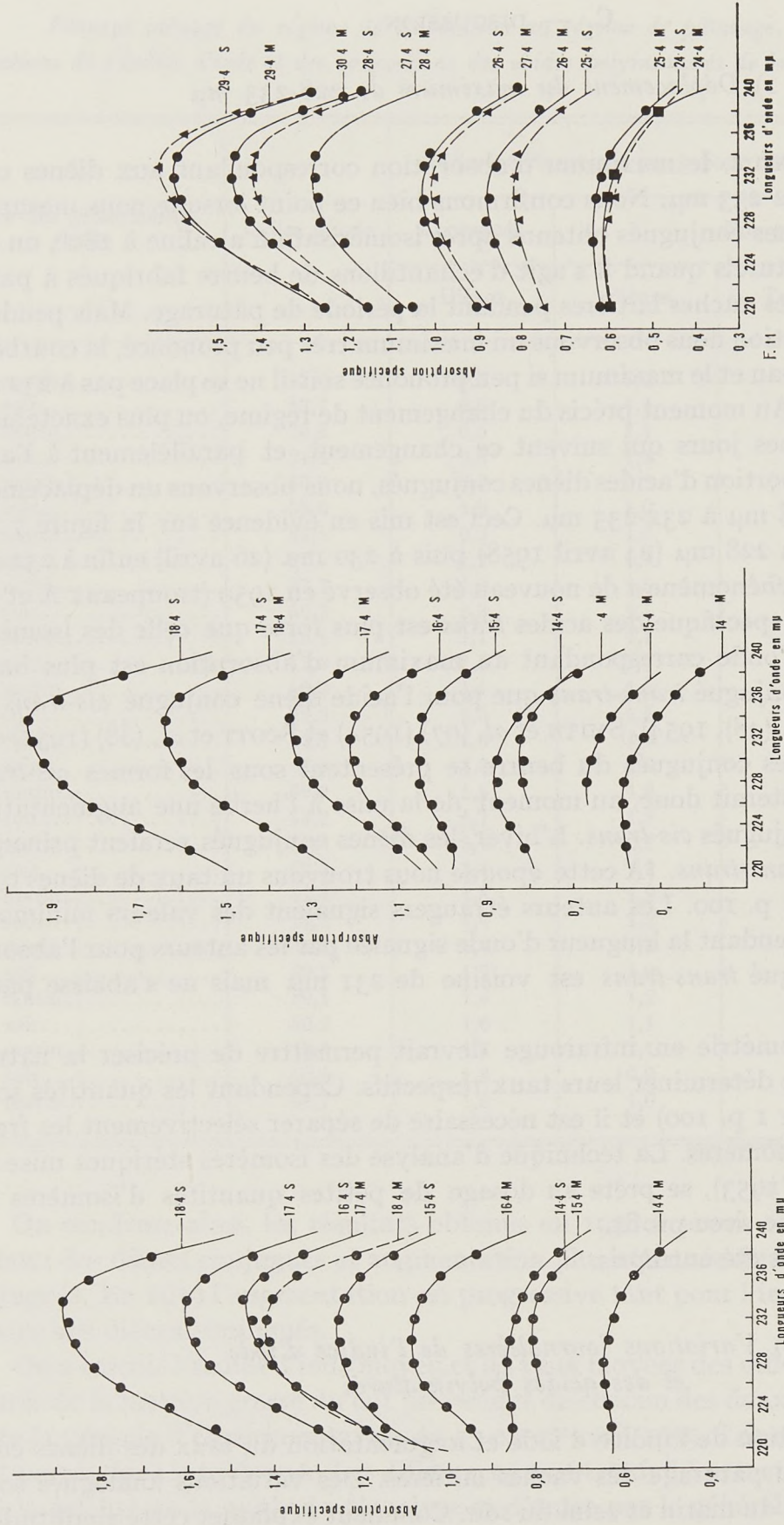
Or l'absorption spécifique des acides *trans* est plus forte que celle des isomères *cis* et la longueur d'onde correspondant au maximum d'absorption est plus basse pour l'acide diène conjugué *trans-trans* que pour l'acide diène conjugué *cis-trans* ou *cis-cis* (HOLMAN et al. (48), 1954). SMITH et al. (97) (1954) et SCOTT et al. (88) (1951) ont montré que les acides conjugués du beurre se présentent sous les formes *cis-trans* et *trans-trans*. Il existerait donc, au moment de la mise à l'herbe une augmentation des acides diènes conjugués *cis-trans*. L'hiver, les diènes conjugués seraient principalement sous forme *trans-trans*. (A cette époque nous trouvons un taux de diènes conjugués d'environ 0,4 p. 100. Les auteurs étrangers signalent des valeurs minimales du même ordre). Cependant la longueur d'onde signalée par les auteurs pour l'absorption du diène conjugué *trans-trans* est voisine de 231 m μ mais ne s'abaisse pas à 228 m μ .

La spectrophotométrie en infrarouge devrait permettre de préciser la nature de ces isomères et de déterminer leurs taux respectifs. Cependant les quantités sont très faibles (moins de 1 p. 100) et il est nécessaire de séparer sélectivement les fractions contenant ces isomères. La technique d'analyse des isomères stériques mise au point par AMAT (4) (1953), se prête au dosage de petites quantités d'isomères et peut être aussi utilisée avec profit.

Ce travail n'a pas été entrepris.

2) *Variations journalières de l'indice d'iode et des acides polyinsaturés*

Il y a augmentation de l'indice d'iode et augmentation du taux des diènes conjugués dès la mise au pâturage des vaches laitières. Des variations analogues sont observées entre le lait du matin et celui du soir. Comment expliquer cette similitude ? Sans doute l'alimentation est-elle en cause. Nous avons vu qu'en régime de passage ménagé on maintenait la différence régulièrement observée entre le soir et le matin.



du 14 au 18 avril 1959 (troupeau B),

du 14 au 18 avril 1959 (troupeau A),

du 24 au 29 avril 1958 (mise à l'herbe le 24 avril)

FIG. 7. — Étude du déplacement du maximum d'absorption à 228-232 mμ, pendant la période de mise à l'herbe
En 1959, introduction d'herbe dans l'alimentation des vaches des troupeaux A et B à partir du 14 avril.

Note : Les mesures de l'absorption ont été effectuées de 220 mμ à 240 mμ, toutes les deux unités. En 1958, l'absorption à 222, 224 et 236 mμ n'a pas été déterminée.

Absorption spécifique = $\frac{l \times c}{l \times c}$
 c = concentration en g de graisse par litre de solvant.

TABLEAU 5

*Passage ménagé du régime de stabulation au régime de pâturage. Troupeau A.
Variations de l'indice d'iode et des proportions des acides polyinsaturés de la matière grasse du lait*

Date des prélèvements (1959)	Indice d'iode	Acides polyinsaturés (en g pour 100 g de matière grasse)			
		Conjugués	Non conjugués		
			Diènes	Triènes	Tétraènes
13-4 matin.....	29,8	0,6	1,0	0,4	0,3
13-4 soir.....	33,5	0,6	1,1	0,5	0,4
14-4 matin.....	28,6	0,4	1,0	0,4	0,4
14-4 soir.....	33,5	0,6	1,1	0,5	0,3
15-4 matin.....	30,5	0,5	1,2	0,5	0,3
15-4 soir.....	34,4	0,8	1,2	0,5	0,4
16-4 matin.....	32,4	0,7	1,1	—	0,3
16-4 soir.....	37,6	1,0	1,3	0,5	0,4
17-4 matin.....	35,0	1,1	1,3	0,4	0,4
17-4 soir.....	37,5	1,3	1,3	0,6	0,4
18-4 matin.....	37,2	1,3	1,5	0,4	0,3
18-4 soir.....	39,9	1,6	1,2	0,5	0,3
19-4 matin.....	37,6	1,3	1,2	0,6	0,3
19-4 soir.....	41,7	1,6	1,3	0,6	0,3
20-4 matin.....	39,4	1,5	1,5	0,2	0,4
20-4 soir.....	42,9	1,8	1,2	0,6	0,3
21-4 matin.....	39,1	1,6	1,2	0,6	0,3
21-4 soir.....	42,1	1,9	1,0	0,8	0,3
22-4 matin.....	41,1	1,6	1,2	0,6	0,3
22-4 soir.....	42,7	1,6	1,3	0,6	0,3
23-4 matin.....	41,7	1,3	1,3	0,7	0,3
23-4 soir.....	42,4	1,5	1,5	0,7	0,4
24-4 matin.....	37,3	1,4	1,1	0,6	0,4
24-4 soir.....	39,2	1,6	1,1	0,7	0,3
25-4 matin.....	38,8	1,6	1,0	0,7	0,4
25-4 soir.....	39,8	1,8	1,2	0,8	0,3
26-4 matin.....	39,4	1,5	1,2	0,7	0,3
26-4 soir.....	40,3	1,8	1,1	0,7	0,3
27-4 matin.....	41,5	1,8	0,9	0,7	0,3

Celle-ci disparaissait au contraire pendant les 48 heures qui suivait la mise au pâturage dans le cas d'un passage brusque. Peut-être comme le suggèrent MAYHEAD et BARNICOAT (75) (1956), les variations journalières de l'indice d'iode ont-elles quelque rapport avec l'horaire de distribution de la nourriture verte. Et peut-être que, pendant les 48 heures qui suivent la mise au pâturage, les vaches mangent alors, même la nuit, l'herbe fraîche dont elles sont friandes. Une étude de comportement permettrait d'infirmer ou de confirmer cette hypothèse.

3) Acides diènes non conjugués

La teneur du beurre en acide linoléique observée pendant cette période de mise à l'herbe, varie relativement peu. De toute façon aucun parallélisme ne peut être

TABLEAU 6

Proportions moyennes des acides polyinsaturés de la matière grasse des laits de mélange correspondant aux troupeaux A et B, du 13 au 27 avril 1959
(en g pour 100 g de matière grasse)

	Indice d'iode	Acides diènes conjugués	Acides non conjugués		
			Diènes	Triènes	Tétraènes
<i>Troupeau A</i>					
Sortie au pâturage : 21 avril	37,8	1,30	1,19	0,58	0,34
<i>Troupeau B</i>					
Sortie au pâturage : 14 avril	38,4	1,29	1,21	0,56	0,34

établi entre la variation au niveau de l'acide linoléique et la variation au niveau de l'indice d'iode ou du taux de diènes conjugués.

Il semble donc que l'alimentation à l'herbe n'a pas modifié le taux de cet acide dans le lait.

Ceci est important car l'acide linoléique est un acide gras « indispensable ». Il est donc logiquement d'origine alimentaire. Le fait que malgré un bouleversement du régime alimentaire, le taux de cet acide dans le lait n'a pas été modifié prouve qu'il existe un système régulateur qui permet le maintien de l'acide linoléique dans le lait à un taux déterminé. La nature de ce système régulateur reste à préciser.

II. — Variations des acides majeurs au cours de la période de mise au pâturage des vaches laitières

HILDITH (44) en 1947, avait déjà signalé les variations des proportions relatives des acides gras majeurs du beurre, à la suite du passage du régime de stabulation au régime de pâturage. La principale modification notée était une diminution du taux de l'acide palmitique compensée par une augmentation du taux d'acide oléique.

L'étude présentée en 1956, par STADHOUDERS et MULDER (103), précise ces observations : du 30 mars 1954 au 2 mai 1954, la proportion d'acide palmitique s'abaisse de 28,6 p. 100 à 22,1 p. 100. Pendant la même période la proportion d'acide oléique s'élève de 23,7 à 31 p. 100 (en moles). Une légère augmentation est également notée pour l'acide stéarique et une légère diminution pour l'acide myristique.

Le travail que nous présentons doit permettre de préciser les variations observées pendant la période de transition du régime de stabulation au régime de pâturage.

L'analyse est conduite sur des échantillons de beurre fabriqués au laboratoire à partir du lait produit à Jouy-en-Josas par les vaches du troupeau expérimental.

A. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

1) Modalités de la mise au paturage.

6 Vaches (3 de race *Normande* et 3 de race Française *Frisonne Pie Noire*) appartenant au troupeau du Centre National de Recherches zootechniques, et toutes approximativement au même stade de lactation, ont été amenées progres-

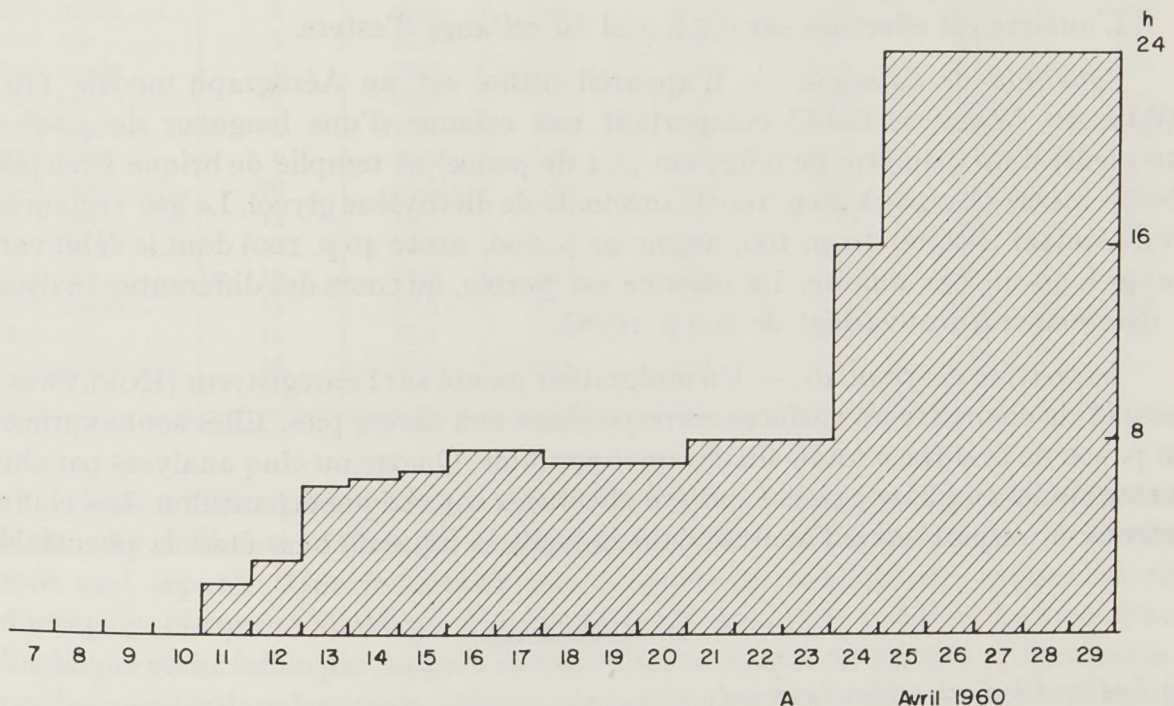
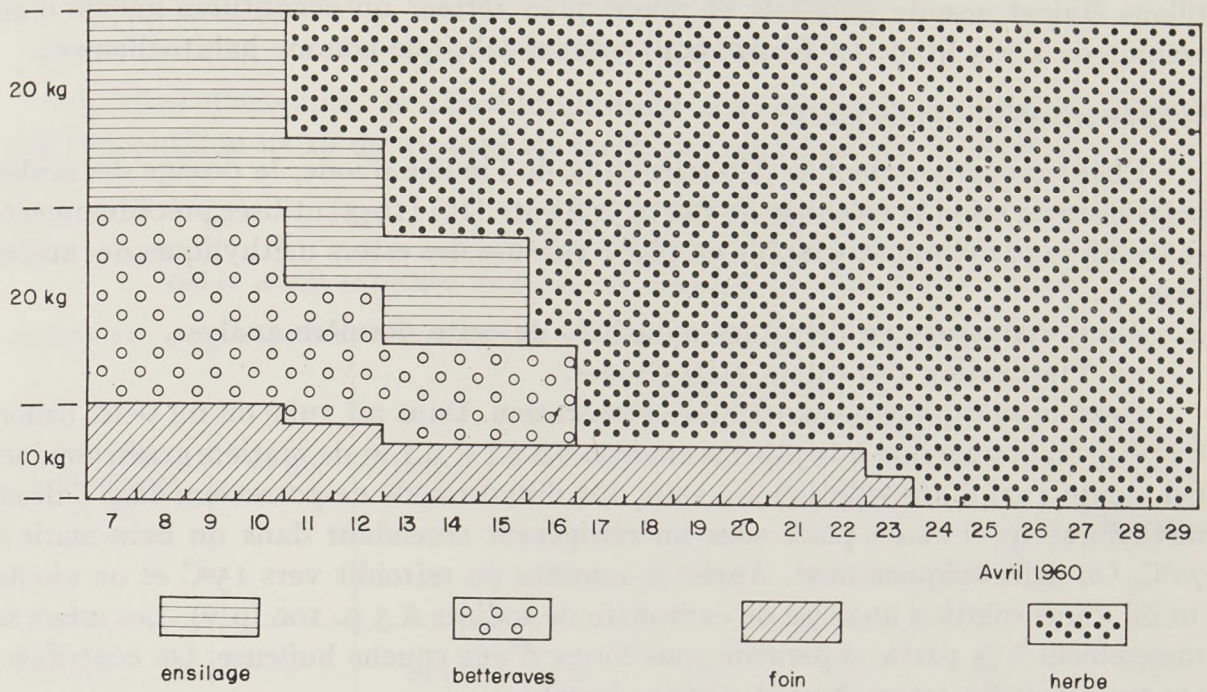


FIG. 8. — Modalités de la mise à l'herbe : période du 7 au 29 avril 1960
Les variations du régime alimentaire des vaches laitières (graphique supérieur) et la durée journalière du pâturage pendant la période expérimentale (graphique inférieur) sont indiquées

sivement du régime de stabulation au régime de pâturage. La figure 8 donne une représentation schématique des changements de régime alimentaire au cours de la période expérimentale qui s'étend du 7 au 29 avril 1960, et de la durée journalière du pâturage.

2) Préparation des échantillons de beurre.

Des échantillons de lait étaient prélevés tous les deux ou trois jours à la traite du matin et à la traite du soir, sur le lait produit par chacune des vaches. Ces échantillons étaient ensuite pondérés et réunis pour former un échantillon moyen d'un volume de 4 à 5 litres. Le beurre était ensuite fabriqué comme habituellement.

3) Déterminations analytiques.

Celles-ci comportaient la détermination de l'indice d'iode, le dosage des acides polyinsaturés selon la méthode de BRICE et SWAIN (10) (1945) utilisée précédemment, et l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras.

Nous donnerons en détail les modalités de cette dernière analyse.

— Préparation des esters méthyliques.

Ceux-ci sont préparés par trans-estérification. Dans un tube ou un petit ballon on pèse, ou l'on mesure à la pipette environ 0,8 g ($\pm$ 0,1 g) de matière grasse fondue. On ajoute 4 ml d'une solution à 0,35 p. 100 d'hydroxyde de potassium dans l'alcool méthylique (p/v) et on place sous un réfrigérant ascendant dans un bain-marie à 70°C. On agite fréquemment. Après 30 minutes on refroidit vers 15°C et on ajoute 10 ml d'une solution aqueuse de carbonate de sodium à 5 p. 100 (p/v). Les esters se rassemblent à la partie supérieure sous forme d'une couche huileuse. On centrifuge. On transvase les esters dans des tubes bouchés.

— Chromatographie.

L'analyse est effectuée sur 0,5 à 2 μ l du mélange d'esters.

Condition de l'analyse. — L'appareil utilisé est un Aérograph modèle 110 C (WILKENS, WALNUT, Calif.) comportant une colonne d'une longueur de 3,048 m (10 pieds) d'un diamètre de 0,635 cm (1/4 de pouce) et remplie de brique à feu pilée (60-80 mesh) chargée à 20 p. 100 de succinate de diéthylène glycol. Le gaz vecteur est de l'hémixal (hélium 20 p. 100, argon 40 p. 100, azote 40 p. 100) dont le débit varie de 40 à 50 ml par minute. La colonne est portée, au cours des différentes analyses, à des températures variant de 200 à 215°C.

Expression des résultats. — Un intégrateur monté sur l'enregistreur (HONEYWELL) permet de connaître les surfaces correspondant aux divers pics. Elles sont exprimées en p. 100 de la surface totale du chromatogramme. Quatre ou cinq analyses par chromatographie en phase gazeuse ont été effectuées sur chaque échantillon. Les chiffres retenus correspondent à l'analyse dans laquelle la ligne de base était la plus stable.

B. RÉSULTATS

α) Indice d'iode et acides insaturés.

Le tableau 7 montre l'augmentation de l'indice d'iode et les variations au niveau des acides polyinsaturés. Les variations sont semblables à celles présentées dans le

paragraphe I : l'indice d'iode est généralement un peu plus élevé le soir que le matin. La teneur en diènes conjugués augmente régulièrement du début à la fin de l'expérience (0,6 à 2,1 g p. 100 g de matière grasse). On note pendant cette même période une faible augmentation de la teneur en triènes non conjugués (teneur minimale 0,4, teneur maximale 0,7 p. 100 g de matière grasse) et une relative stabilité des teneurs en diènes et tétraènes non conjugués (valeurs moyennes respectives : 1,1 et 0,3 g p. 100 g de matière grasse).

β Résultats de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

— Valeur de l'analyse.

A titre d'exemple, le chromatogramme correspondant à l'analyse effectuée sur l'échantillon n° 16 du 29 avril au matin est reproduit sur la figure 9.

TABLEAU 7

Indice d'iode et teneurs en acides polyinsaturés des échantillons de beurre

Date des prélèvements (1960)	N° des échantillons	Indice d'iode	Acides polyinsaturés (en g p. 100 g de matière grasse)				« Monoènes » (Calculé) en g p. 100 g acides totaux
			Conjugué	Non conjugués			
				Diène	Diène	Triène	
7-4 soir	1	29,6	0,72	1,27	0,39	0,34	31,0
8-4 matin	2	26,5	0,63	1,20	0,47	0,33	27,0
11-4 soir	3	31,6	0,82	1,39	0,50	0,32	32,8
12-4 matin	4	29,1	0,65	0,99	0,39	0,39	30,9
13-4 soir	5	35,3	1,01	0,82	0,50	0,26	38,3
14-4 matin	6	31,2	0,87	1,42	0,51	0,35	31,9
15-4 soir	7	38,2	1,37	1,61	0,56	0,29	39,6
16-4 matin	8	33,4	1,12	0,73	0,50	0,32	35,8
19-4 matin	9	33,6	1,35	1,05	0,56	0,34	34,8
19-4 soir	10	44,6	1,60	1,00	0,69	0,27	47,9
21-4 soir	11	42,7	1,87	1,06	0,70	0,21	45,2
22-4 matin	12	38,9	1,78	0,96	0,64	0,29	40,8
25-4 soir	13	39,2	2,09	0,80	0,54	0,21	41,4
26-4 matin	14	37,8	2,12	0,86	0,46	0,27	39,1
28-4 soir	15	37,7	2,07	0,91	0,45	0,26	38,9
29-4 matin	16	39,1	2,10	0,90	0,49	0,24	41,0

Nous n'avons pas obtenu, dans les conditions indiquées, une très bonne résolution des différents acides. En particulier les acides stéarique, oléique et linoléique sont mal séparés. Une évaluation des proportions relatives des acides stéarique d'une part, oléique et linoléique d'autre part, est cependant possible. Le taux d'acide linoléique étant faible par rapport au taux d'acide oléique (cf tableau 7), la réunion de ces deux acides dans le groupe « oléique » ne modifie pas le sens général des observations. De même nous avons réuni dans les groupes d'acides saturés en C₁₂, C₁₄ et C₁₆, les acides formant des pics mineurs adjacents aux pics principaux. Les techniques de

préparation et de récupération des esters que nous avons utilisées, ne permettent pas d'éviter des pertes au niveau des acides à bas poids moléculaires notamment au niveau des acides caproïque et butyrique. Lorsqu'on détermine quantitativement le taux de ces acides (par la technique de FRANCESCO et AVANCINI (28) (1961), par exemple) on trouve qu'ensemble ils constituent environ 5 p. 100 des acides totaux. Les variations au niveau des acides majeurs du beurre sont donc peu affectées par l'imprécision des résultats au niveau des acides à bas poids moléculaire.

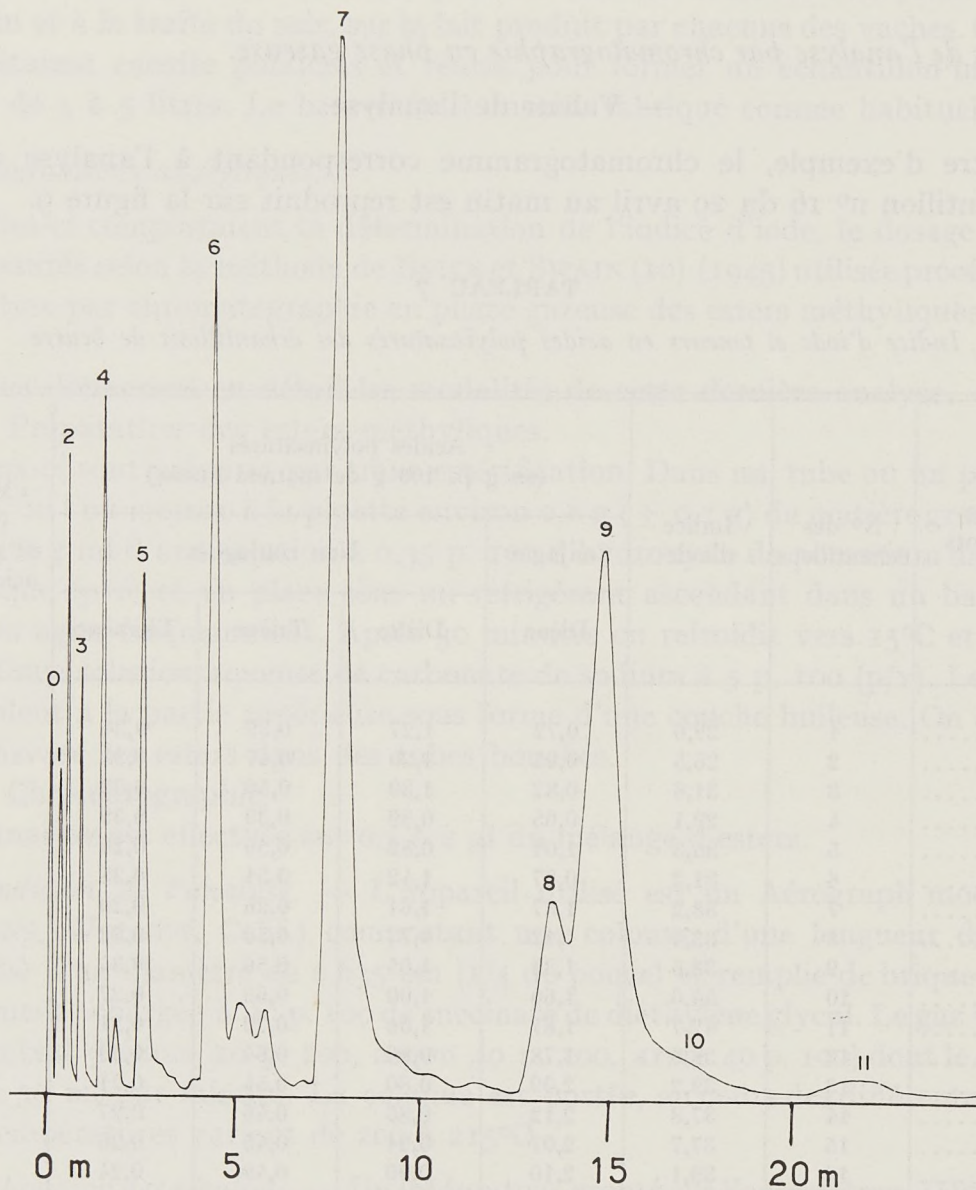


FIG. 9. — Esters méthyliques des acides gras du lait de vache

- | | | |
|-------------------|-------------------|----------------------|
| 1) ac. butyrique | 5) ac. laurique | 9) ac. oléique |
| 2) ac. caproïque | 6) ac. myristique | 10) ac. linoléique |
| 3) ac. caprylique | 7) ac. palmitique | 11) ac. linoléinique |
| 4) ac. caprique | 8) ac. stéarique | |

— Résultats des analyses concernant les acides à longue chaîne.

Ces résultats sont portés dans le tableau 8. On relève des variations de grande amplitude concernant chaque acide ou groupe d'acides.

Les proportions minimales d'acide oléique et stéarique sont très faibles (respectivement 18,4 et 1,6 p. 100). A ces valeurs correspondent des proportions très élevées des acides laurique, myristique et palmitique.

TABLEAU 8

Résultats des analyses par chromatographie en phase gazeuse (exprimés en p. 100 (surface p. 100) des esters méthyliques)

Date des prélèvements (1960)	N° des échantillons	Groupe C ₁₂	Groupe C ₁₄	Groupe C ₁₆	Acide stéarique	Acide oléique
7-4 soir.....	1	—	—	—	—	—
8-4 matin.....	2	6,8	21,0	43,1	1,6	18,4
11-4 soir.....	3	5,9	19,4	41,8	2,8	23,0
12-4 matin.....	4	6,7	16,7	44,2	1,9	21,3
13-4 soir.....	5	5,1	17,6	38,3	3,7	28,4
14-4 matin.....	6	5,3	18,5	40,4	2,5	24,5
15-4 soir.....	7	3,7	15,2	31,7	7,3	30,4
16-4 matin.....	8	4,2	15,4	36,6	4,6	32,5
19-4 matin.....	9	4,7	16,0	33,1	7,5	32,3
19-4 soir.....	10	2,2	10,8	32,7	7,6	44,1
21-4 soir.....	11	2,6	12,2	33,7	8,4	38,6
22-4 matin.....	12	4,0	15,2	33,2	8,1	33,8
25-4 soir.....	13	3,1	14,7	29,8	7,8	38,8
26-4 matin.....	14	4,4	15,7	31,8	10,2	31,2
28-4 soir.....	15	5,1	16,4	32,9	7,4	32,7
29-4 matin.....	16	5,2	16,7	30,6	6,8	32,5

TABLEAU 9

Coefficients de corrélation
(Significatifs avec une sécurité de $P = 99$ p. 100)

	Indice d'iode	Acide stéarique %	Acide palmitique %	Acide myristique %	Acide laurique %
Acide oléique (%)	0,93	0,78	— 0,81	— 0,90	— 0,93

La figure 10 permet de comparer l'aspect des chromatogrammes correspondant aux échantillons 2 et 10 dont les indices d'iode respectifs sont 26,5 et 44,6.

Le tableau 9 donne quelques coefficients de corrélation. On relève une corrélation négative entre le taux d'acide oléique et les taux respectifs des acides laurique, myristique et palmitique. On note par contre une corrélation positive entre les taux d'acide oléique et d'acide stéarique.

C. — DISCUSSION

Les résultats de nos analyses conduisent à une conclusion qui rejoint celle de STADHOUDERS et MULDER (103) (1956). L'amplitude des variations que nous relevons est cependant plus grande que celle signalée par STADHOUDERS et MULDER (103),

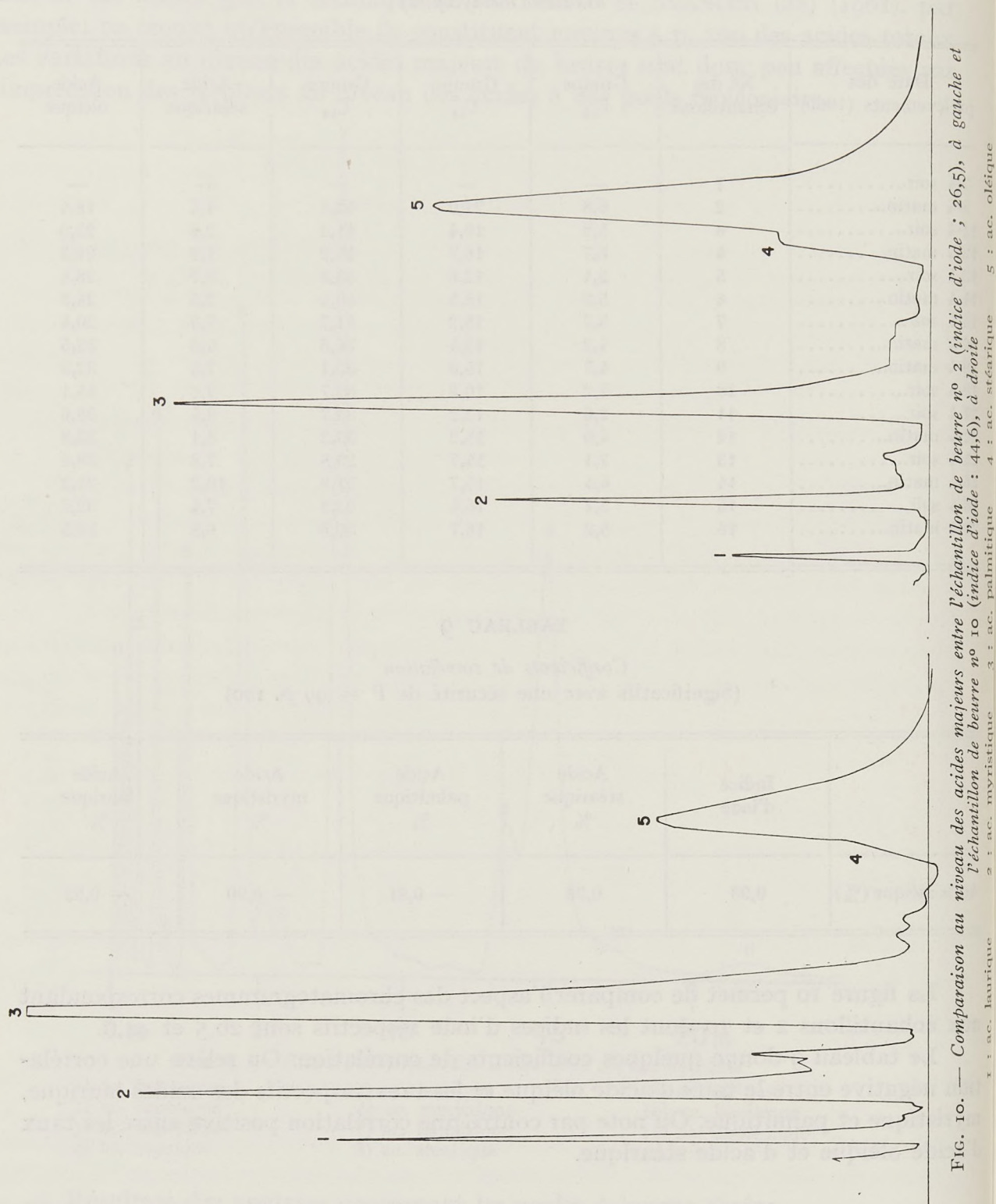


FIG. 10. — Comparaison au niveau des acides majeurs entre l'échantillon de beurre n° 2 (indice d'iode ; 26,5), à gauche et l'échantillon de beurre n° 10 (indice d'iode : 44,6), à droite
 1 : ac. laurique 2 : ac. myristique 3 : ac. palmitique 4 : ac. stéarique 5 : ac. oléique

mais il faut noter que les indices d'iode de nos échantillons de beurre s'échelonnent de 26,5 à 44,6 alors que ceux des auteurs précédents varient de 32,1 à 46,6.

Les cinq acides étudiés se répartissent quant au sens des variations observées, en deux groupes : acides stéarique et oléique d'une part ; acides laurique, myristique et palmitique d'autre part.

Les études concernant l'origine des acides gras du lait de vache ont établi que ceux-ci peuvent avoir une double origine : soit résulter d'une biosynthèse au niveau de la glande mammaire (acides de C_4 à C_{16} principalement), soit provenir des acides gras des lipides plasmatiques (acides à 18 atomes de carbone principalement).

L'évolution que nous avons notée, dans les proportions relatives des acides majeurs du beurre, au cours de la période de changement de régime semble montrer qu'une modification est intervenue dans l'importance relative des deux sources d'acides gras du lait.

Nous savons depuis les travaux déjà anciens de SMITH et CHIBNALL (96) (1932), que les acides gras de l'herbe et des fourrages sont constitués principalement par des acides polyinsaturés à 18 atomes de carbone, l'acide palmitique constituant par ailleurs la presque totalité des acides saturés, parmi lesquels ne se trouve qu'une minime proportion d'acide laurique (JASPERSON et BURKE (51), 1945 ; SHORLAND (90), 1953).

Si, d'une façon générale l'activité de synthèse lipidique au niveau de la glande mammaire est réduite du fait d'un apport supplémentaire en lipides d'origine alimentaire, lipides de l'herbe par exemple, cette diminution sera moins prononcée pour l'acide palmitique que pour l'acide laurique d'origine uniquement biosynthétique. C'est effectivement ce que l'on constate, la proportion d'acide palmitique a diminué de 44 à 30 p. 100, soit d'un tiers, alors que celle d'acide laurique a diminué de 6,8 à 2,2 p. 100 soit de deux tiers. Dans le même temps, la proportion d'acide oléique a plus que doublé ; celle d'acide stéarique a plus que triplé.

CHAPITRE II

VARIATIONS DES ACIDES POLYINSATURÉS
DU BEURRE AU COURS DE L'ANNÉE

I. — Introduction

L'étude, au cours de la période de mise à l'herbe des vaches laitières a permis de mettre en évidence des évolutions différentes selon l'un ou l'autre des acides polyinsaturés. Étant donné l'intérêt que présente l'augmentation des connaissances concernant les acides polyinsaturés pour les nutritionnistes (problème des acides indispensables) et pour les technologues (problème de l'oxydation), il nous a paru utile de préciser quelles sont, en France, au cours de l'année, les variations observées au niveau des différents acides polyinsaturés du beurre.

RIEL (85) (1963), a comparé les résultats obtenus par les divers auteurs qui se sont préoccupés d'étudier les variations saisonnières des acides polyinsaturés du beurre.

Cette comparaison montre que pour tous les auteurs la variation de l'acide diène conjugué est étroitement liée à celle de l'indice d'iode du beurre.

La teneur en diènes conjugués varie donc considérablement au cours de l'année ; on observe une teneur maximale vers la fin de l'été dans les pays où le régime de stabulation alterne avec le régime de pâturage. Par contre lorsque les vaches restent au pâturage toute l'année (cas de la Nouvelle-Zélande) l'indice d'iode est minimal pendant l'été et la teneur du beurre en diènes conjugués atteint elle-même sa valeur minimale à la même époque.

Un certain désaccord apparaît si l'on confronte les différentes publications concernant les diènes non conjugués. Selon STADHOUDERS et MULDER (102) (1955) il y a moins de diènes non conjugués pendant la période de pâturage que pendant la période de stabulation. D'après d'autres travaux (MATTSSON, THOME et SWARTLING (73), 1951 ; WOOD et HAAB (111), 1957), il semble que la teneur en diènes non conjugués du beurre reste relativement stable au cours de l'année.

Nous présenterons ci-dessous les résultats que nous avons obtenus à Jouy-en-Josas au Centre National de Recherches Zootechniques.

II. — Matériel et méthodes

Le troupeau expérimental était constitué par une vingtaine de vaches dont la moitié était de race Française *Frisonne* Pie noire, et l'autre de race *Normande*. Au cours des 12 mois d'expérience, d'avril 1959 à mai 1960, le stade de lactation des vaches était

approximativement compris entre le 2^e et le 7^e mois. Elles étaient toutes soumises aux mêmes conditions d'alimentation et de vie. La rentrée à l'étable eut lieu au début de novembre 1959. Environ une fois par mois, un échantillon moyen pondéré du lait produit à chaque traite par les vaches du troupeau expérimental était préparé. Le beurre était fabriqué dans les mêmes conditions que celles indiquées dans le chapitre I.

L'indice d'iode de la matière grasse a été déterminé et les acides polyinsaturés ont été dosés comme précédemment.

TABLEAU 10

Indice d'iode et teneur en acides polyinsaturés du beurre

Date des prélèvements	Indice d'iode	Acides polyinsaturés (en g p. 100 g de matière grasse)			
		Conjugués I		Non conjugués	
		Diènes	Diènes	Triènes	Tétraènes
13-4-59 soir	33,7	0,6	1,2	0,5	0,4
13-4-59 matin	27,6	0,5	1,0	0,4	0,4
22-4-59 soir	45,5	1,6	1,2	0,8	0,3
22-4-59 matin	41,4	1,4	1,2	0,7	0,2
21-5-59 soir	43,8	1,5	1,0	0,6	0,4
22-5-59 matin	42,1	1,3	1,2	0,6	0,4
25-6-59 soir	44,7	1,5	1,2	0,8	0,4
26-6-59 matin	42,5	1,6	1,2	0,8	0,4
24-7-59 soir	39,4	1,6	1,0	0,4	0,3
24-7-59 matin	37,1	1,5	1,0	0,5	0,3
6-9-59 soir	42,7	1,9	0,9	0,6	0,3
7-9-59 matin	39,6	1,6	0,7	0,5	0,3
29-9-59 soir	39,8	1,7	—	0,7	0,3
30-9-59 matin	38,2	1,5	—	0,6	0,3
29-10-59 soir	46,2	1,7	1,0	0,7	0,4
30-10-59 matin	45,3	1,7	1,1	0,7	0,4
1-12-59 soir	28,7	0,5	1,3	0,4	0,4
2-12-59 matin	26,4	0,4	1,3	0,3	0,4
4-1-60 soir	28,2	0,5	1,2	0,5	0,4
5-1-60 matin	26,4	0,5	1,3	0,5	0,4
10-2-60 soir	26,3	0,5	1,3	0,4	0,3
11-2-60 matin	24,4	0,5	1,3	0,4	0,3
1-3-60 soir	26,2	0,5	1,0	0,4	6,3
2-3-60 matin	24,9	0,4	1,2	0,3	0,3
4-4-60 soir	27,9	0,6	1,1	0,4	0,3
5-4-60 matin	26,7	0,4	1,0	0,4	0,3
19-4-60 soir	44,6	1,6	1,0	0,7	0,3
19-4-60 matin	38,6	1,4	1,0	0,6	0,3

III. — Résultats

Les résultats sont présentés dans le tableau 10 et sur les figures 11 et 12.

1) *Acides conjugués*

La courbe de variation de la teneur en acides diènes conjugués du beurre est assez semblable à celle de l'indice d'iode. En effet cette teneur est nettement plus

élevée pendant la période de pâturage que pendant la période de stabulation (teneurs moyennes respectives 1,6 et 0,5). Au cours de l'hiver la teneur en acides diènes conjugués reste pratiquement constante alors qu'au cours de la période de pâturage on relève des fluctuations notables.

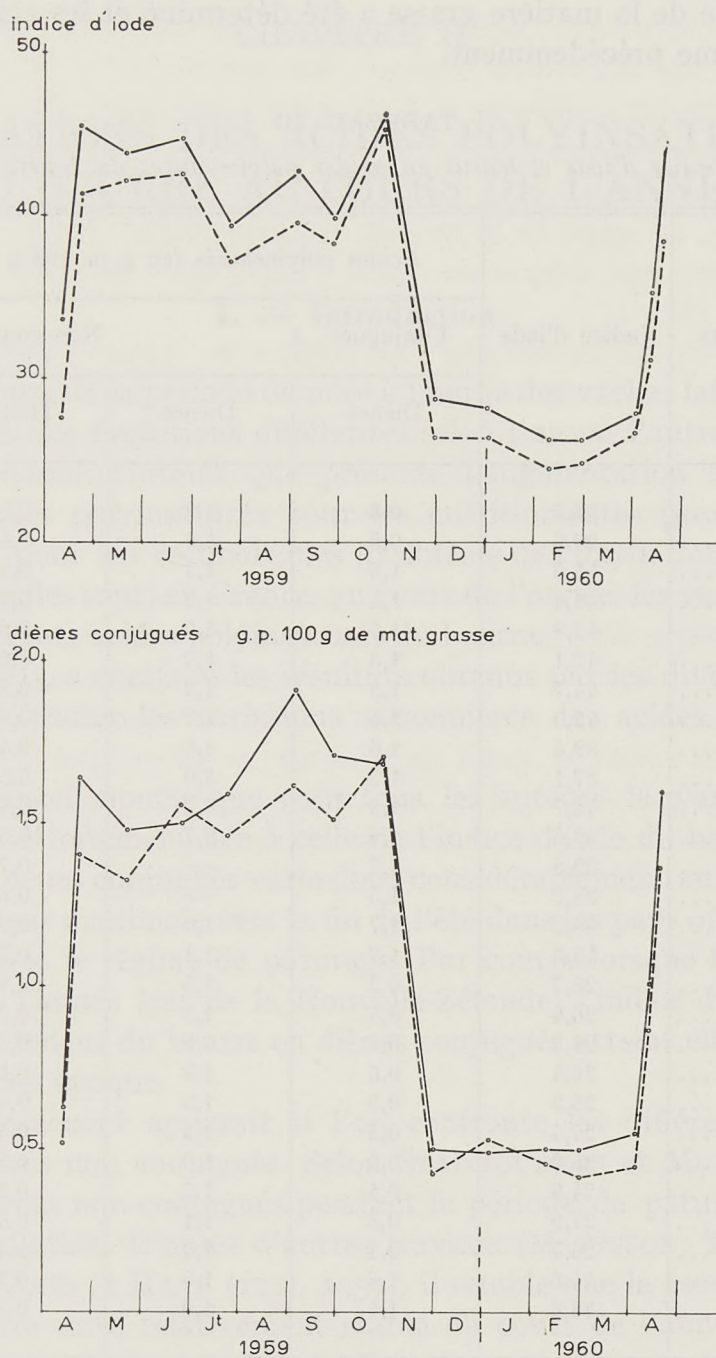


FIG 11. — Variation de l'indice d'iode du beurre et variation de la teneur du beurre en acides gras diènes conjugués
 ———— soir ———— matin

Les acides triènes et tétraènes conjugués se rencontrent en quantité très faible. Les teneurs moyennes trouvées au cours de notre étude sont 0,013 (valeurs extrêmes 0,007 et 0,019) pour les triènes conjugués et 0,002 pour les tétraènes conjugués.

2) *Acides non conjugués*

Au cours de l'année, les teneurs en acides diènes non conjugués varient peu comparativement à ce que l'on observe pour l'acide diène conjugué. Cependant on note une diminution notable pendant les mois de juillet et août 1959. Les teneurs moyennes sont 1,05 et 1,18 respectivement pour les périodes de pâturage et de stabulation.

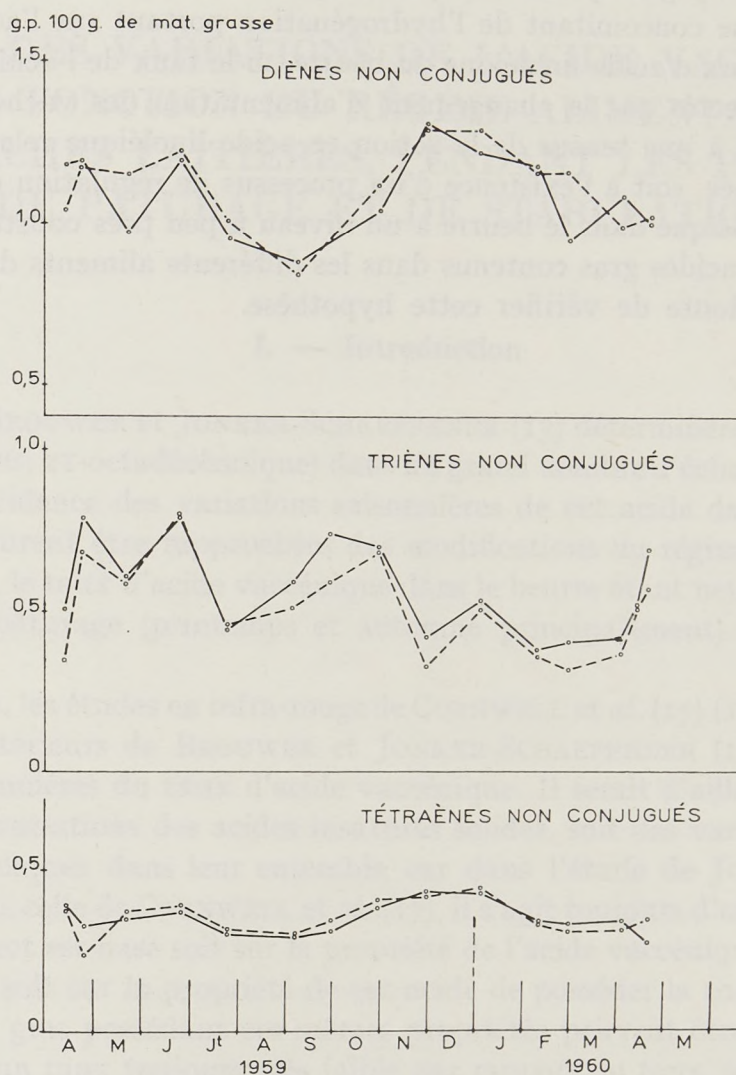


FIG. 12. — Variations des teneurs du beurre en acides gras diènes, triènes et tétraènes non conjugués
——— soir ——— matin

La teneur en acides triènes non conjugués varie avec la saison. La valeur moyenne est un peu plus élevée pendant la période de pâturage (0,64) (au cours de laquelle on observe des variations importantes) que pendant la période de stabulation (0,40)

L'amplitude de variation de l'acide arachidonique (acide tétraène non conjugué) est faible et du même ordre que celle correspondant à l'acide diène non conjugué.) Comme pour ce dernier on trouve une teneur très légèrement plus forte pendant la période de stabulation que pendant la période de pâturage.

L'analyse spectrophotométrique effectuée après isomérisation alcaline révèle la présence constante d'un léger pic à 346-348 m μ dû à l'absorption spécifique d'un acide pentaène dont le taux n'a pas été calculé.

IV. — Discussion

La présence ou l'absence d'herbe fraîche dans l'alimentation des vaches laitières, semble donc être le facteur principal, conditionnant les variations observées.

Le parallélisme étroit entre la variation de l'indice d'iode et l'accroissement du taux de diènes conjugués permet de penser que la formation des diènes conjugués est un phénomène concomitant de l'hydrogénation portant sur l'acide linoléique.

Mais ni le taux d'acide linoléique du beurre, ni le taux de l'acide arachidonique ne paraissent affectés par le changement d'alimentation des vaches laitières. Ceci peut être dû soit à une teneur de la ration en acide linoléique relativement stable au cours de l'année, soit à l'existence d'un processus de régulation qui maintient le taux d'acide linoléique dans le beurre à un niveau à peu près constant.

L'étude des acides gras contenus dans les différents aliments de la ration nous permettra sans doute de vérifier cette hypothèse.

CHAPITRE III

ÉTUDE DES VARIATIONS DE L'ACIDE VACCENIQUE EN FONCTION DU RÉGIME ALIMENTAIRE DES VACHES LAITIÈRES, PENDANT LES PÉRIODES DE PATURAGE ET DE STABULATION

I. — Introduction

En 1947, BROUWER et JONKER-SCHAEFFENER (13) déterminèrent le taux d'acide vaccénique (*trans*, 11-octadécénoïque) dans un grand nombre d'échantillons de beurre et mirent en évidence des variations saisonnières de cet acide dans le beurre. Ces modifications purent être rapprochées des modifications du régime alimentaire des vaches laitières, le taux d'acide vaccénique dans le beurre étant nettement plus élevé en période de pâturage (printemps et automne principalement) qu'en période de stabulation.

Par ailleurs, les études en infra-rouge de CORNWELL et *al.* (17) (1953) confirmèrent les résultats antérieurs de BROUWER et JONKER-SCHAEFFENER (13) concernant les variations saisonnières du taux d'acide vaccénique. Il serait d'ailleurs plus juste de parler soit des variations des acides insaturés solides, soit des variations des acides *trans*-octadécénoïques dans leur ensemble car dans l'étude de JONKER-SCHAEFFENER comme dans celle de CORNWELL et *al.* (17), il s'agit toujours d'un dosage indirect. Ce dosage indirect est basé soit sur la propriété de l'acide vaccénique d'être un acide insaturé solide, soit sur la propriété de cet acide de posséder la configuration *trans*. D'autres acides gras possédant ces mêmes propriétés peuvent être présents dans le beurre, mais à un taux toujours très faible par rapport au taux réel d'acide vaccénique (BACKDERF et BROWN (7), 1958).

Nous avons nous-même dosé indirectement l'acide vaccénique du beurre, et étudié les variations saisonnières du taux de cet acide.

Nous décrirons rapidement la méthode utilisée, nous en discuterons la valeur et nous insisterons sur la signification des résultats quant au problème de l'origine de l'acide vaccénique dans le beurre.

II. — Matériel et méthodes

Sur une série d'échantillons de beurre fabriqués en Normandie, à Bayeux et en Alsace à Riedseltz nous avons régulièrement déterminé pendant près de trois ans, une ou deux fois par mois, l'indice d'iode du beurre, et les proportions relatives des

acides solides et liquides, telles que nous les avons obtenues en utilisant la méthode de TWITCHELL (105) (1921) décrite par HILDITCH (44) (1947). Cette méthode est basée comme celle de GROSSFELD et SIMMER (37) (1930), utilisée par BROUWER et JONKER-SCHAEFFENER (13) (1947) sur la différence de solubilité dans l'alcool acétique des sels de plomb des acides gras.

Les indices d'iode des fractions « acides solides » et « acides liquides » étaient en outre déterminés. A partir de l'indice d'iode des acides solides, le taux d' « acide vaccénique » était calculé par la formule suivante :

« acide vaccénique » =
$$\frac{\text{Indice d'iode ac. solides} \times \text{p. 100 ac. solides}}{89}$$

(en p. 100 des acides totaux du beurre)

TABLEAU II

Étude de la séparation des acides « liquides et » « solides »

Mélange WK 1

	C ₁₀ caprique	C ₁₄ myristique	C _{18:1} vaccénique	C _{18:1} oléique
Composition en				
P. 100 des acides totaux.....	23,5	23,5	23,5	29,5
P. 100 des acides solides (33,3)		42,3		57,7
P. 100 des acides liquides (66,7)	33,3	19,5		47,2
Répartition				
Dans les solides.....	0	52		39
Dans les liquides.....	100	48		61

Mélange WK 2

	C ₁₄ myristique	C ₁₆ palmitique	C _{18:1} vaccénique	C _{18:2} linoléique
Composition en				
P. 100 des acides totaux	5,7	21,1	32,3	40,9
P. 100 des acides solides (53,0).....	8,4	41,0	50,6	
P. 100 des acides liquides (47,0).....	7,3	7,9	15,1	69,7 (par UV : 65,6)
Répartition				
Dans les solides.....	56	85	80	0
Dans les liquides.....	44	15	20	100

Étude critique de la méthode de TWITCHELL

Nous avons vérifié la répartition des acides gras dans les fractions « solides » et « liquides » lors de l'utilisation de la technique de séparation des sels de plomb dans les

conditions où nous nous sommes placés. Pour cela nous avons utilisé la technique de chromatographie en phase gazeuse, que nous avons appliquée à l'étude de mélanges variés d'acides gras purs (les résultats sont portés dans les tableaux 11 et 12) et au

TABLEAU 12

Étude de la séparation des acides « liquides » et « solides »

Mélange FB 1

	C ₁₂ laurique	C ₁₄ myris- tique	C ₁₆ palmi- tique	C _{18:0} stéarique	C _{18:1} vaccé- nique	C _{18:1} oléique
Composition en						
P. 100 des acides totaux	7,4	13,5	23,8	19,8	12,8	22,7
P. 100 des acides solides (44,7).....	1,2	13,8	39,2	28,7	17,1	
P. 100 des acides liquides (55,3).....	20,2	18,0	7,0	0	54,7	
Répartition						
Dans les solides	4,6	38	82	100	20,2	
Dans les liquides	95,4	62	18	0	79,8	

Mélange FB 2

	C ₁₂ laurique	C ₁₄ myristique	C ₁₆ palmitique	C _{18:0} stéarique	C _{18:1} oléique
Composition en					
P. 100 des acides du mélange	9,8	17,8	24,5	13,5	34,4
P. 100 des acides solides (52,6)	2,2	26,5	51,0	20,3	0
P. 100 des acides liquides (47,4)	20,5	17,7	5,8	2,2	53,8
Répartition					
Dans les solides	10	62,4	90,7	91,0	0
Dans les liquides	90	37,6	9,3	9,0	100

mélange complexe des acides gras du beurre (tabl. 13). Cette étude analytique a permis d'établir que les acides se répartissaient ainsi :

— les acides de C₄ à C₁₂ passent totalement dans les acides liquides. Il arrive cependant que l'on rencontre des traces de C₁₂ dans les acides solides ;

— l'acide myristique se répartit dans les deux fractions à peu près également ; cependant cette répartition est sujette à variation dans les limites de 40-60 p. 100 ;

— l'acide palmitique passe dans la proportion de 85 à 90 p. 100 dans les acides solides. L'acide stéarique passe entièrement dans les acides solides.

En ce qui concerne les insaturés, l'acide oléique et à plus forte raison l'acide linoléique passent totalement dans la fraction « acides liquides ».

Nous avons relevé quelques observations intéressantes concernant les acides

TABEAU I 3
Séparation des acides solides et liquides sur le beurre T₄

	C ₆	C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄ (+ 15)	C ₁₆ (+ 17)	C _{18 : 0}	C _{18 : 1}	C _{18 : 2 + 18 : 3}
Composition des acides totaux									
En poids.....	0,457	0,416	0,253	0,253	0,862	2,455	0,718	2,011	0,314
En %.....	2,3	4,7	3,7	3,7	12,6	31,5	10,5	29,4	4,6
Composition des acides solides									
En poids.....	—	—	—	tr	0,343	1,74	0,661	0,258	
En %.....	—	—	—	tr	44,4	57,9	22,0	8,6	
Composition des acides liquides									18 : 3
En poids.....	0,077	0,099	0,241	0,256	0,494	0,315	0,037	1,913	0,198
En %.....	2,4	2,7	6,6	7,0	13,5	8,6	1,0	52,3	(0,029)
Total ac. sol. + ac. liq.									(0,8)
En poids.....	0,077	0,099	0,241	0,256	0,837	2,056	0,698	2,172	0,227
% retrouvé	49,1 (1)	85,4 (1)	95,3	101,2	97,1	94,5	97,6	108,0	72,3
Répartition									
Dans les ac. solides	0	0	0	tr	41	84,6	94,6	11,6	0
Dans les ac. liquides	100	100	100	100	59	15,4	5,4	88,4	100

(1) Pertes dues à la volatilité des acides.

mineurs apparaissant entre C_{14} et C_{18} . En premier lieu, des deux pics régulièrement observés entre le C_{14} et le C_{16} l'un passe dans la fraction liquide et l'autre dans la fraction solide. Le premier pic correspond donc au moins en majeure partie à l'acide C_{14} insaturé, et le second à l'acide en C_{15} . En second lieu, entre C_{16} et C_{18} il y a également une ségrégation des pics mineurs, et l'on retrouve dans les acides liquides le pic correspondant à l'acide C_{17} insaturé dont la présence dans le beurre est maintenant bien établie (HANSEN *et al.* (39), 1960 ; SANBASIVARAO et BROWN (87), 1962 ; BADINGS (8), 1962 ; HERB *et al.* (43), 1962).

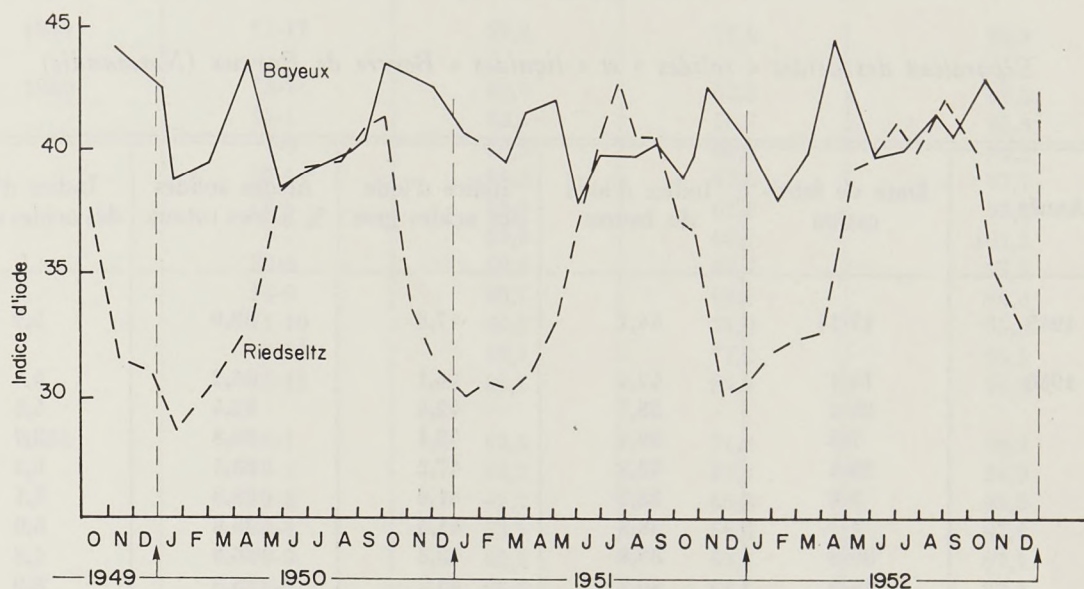


FIG. 13. — Variation de l'indice d'iode du beurre

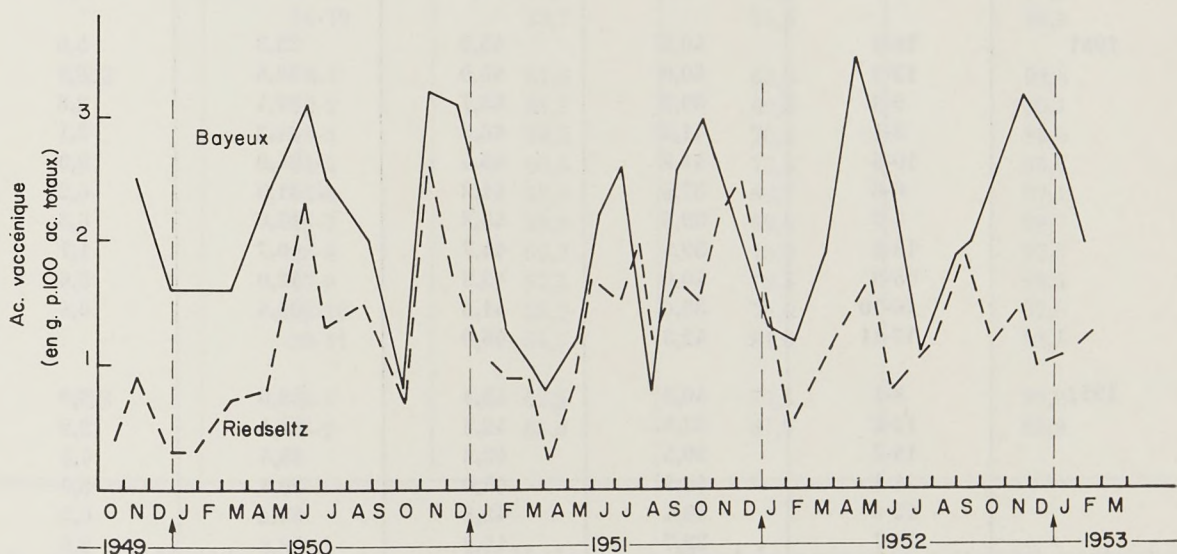


FIG. 14. — Variation du taux d'acide vaccénique dans le beurre

En ce qui concerne l'acide vaccénique il semblerait résulter des analyses présentées dans les tableaux II et 12, qu'une proportion variable (20 à 25 p. 100) de l'acide vaccénique que nous avons utilisé comme acide de référence peut rester dans les acides liquides. Il n'en reste pas moins que l'insaturation des acides solides a pour origine la seule présence de l'acide vaccénique. Par conséquent le dosage indirect

de l'acide vaccénique, tel que BROUWER et JONKE-SCHAEFFENER (13) (1946) et nous-mêmes l'avons utilisé est justifié.

Comme nous l'avons signalé plus haut d'autres isomères de l'acide oléique à configuration *trans* pourraient s'ajouter à l'acide vaccénique dans les acides solides s'ils étaient présents. Mais le beurre ne contient pas d'acide élaïdique (BACKDERF et BROWN (7), 1958). Par contre le beurre contient une faible proportion, voisine de

TABLEAU 14

Séparation des acides « solides » et « liquides » Beurre de Bayeux (Normandie)

Année	Date de fabrication	Indice d'iode du beurre	Indice d'iode des acides gras	Acides solides % acides totaux	Indice d'iode des acides solides
1949	17-11	44,1	47,8	39,0	5,2
1950	13-1	42,4	46,1	36,2	4,0
	24-1	38,7	42,4	32,4	4,5
	7-3	39,4	43,1	38,8	3,7
	25-4	43,5	47,2	33,5	6,3
	3-6	38,3	41,0	38,3	7,1
	1-7	38,8	41,5	36,6	6,0
	30-8	39,8	43,8	36,9	4,8
	16-9	40,2	45,7	35,3	3,9
	11-10	43,3	47,8	35,3	2,1
	9-11	42,8	48,1	35,4	8,6
	12-12	42,3	46,0	38,7	7,2
1951	16-1	40,5	45,2	35,3	5,6
	13-2	40,0	45,0	36,6	3,1
	9-3	39,3	43,7	32,4	2,8
	3-4	41,3	46,8	34,2	2,1
	10-5	41,8	45,4	34,9	3,0
	6-6	37,6	41,3	31,3	6,2
	4-7	39,6	43,3	37,0	6,3
	18-8	39,5	44,7	40,7	1,7
	15-9	40,0	43,8	42,0	5,6
	16-10	38,6	41,3	39,6	6,8
	17-11	42,3	46,0		
1952	8-1	40,0	43,8	38,0	3,0
	12-2	37,9	42,2	38,4	2,9
	18-3	39,5	43,8	38,4	4,5
	24-4	44,2	48,0	39,1	8,0
	12-6	39,4	43,8	34,2	6,3
	16-7	39,7	44,2	38,8	2,6
	28-8	41,2	44,8	37,1	4,6
	17-9	40,2	44,2	40,9	4,3
	28-10	42,5	46,1	42,4	5,9
	20-11	41,4	45,5	43,4	6,6
1953	6-1	39,0	43,8	37,4	6,5
	6-2	37,4	42,2	33,9	5,2
	10-3	39,1	42,6		
	30-3	41,0	45,1		

TABLEAU 14 (*suite*)*Séparation des acides «solides» et «liquides» beurre de Bayeux (Normandie)*

Année	Date de fabrication	Acides liquides % acides totaux	Indice d'iode des acides liquides	Acides solides + Acides liquides % acides totaux
1949	17-11	59,8	71,4	98,8
1950	13-1	62,3	62,5	98,5
	24-1	63,4	66,7	95,8
	7-3	60,5	64,5	99,3
	25-4	64,2	67,4	97,7
	3-6	55,2	67,3	93,5
	1-7	64,6	60,7	101,2
	30-8	60,6	68,7	97,5
	16-9	60,7	68,6	96,0
	11-10	60,6	71,9	95,9
	9-11	59,1	77,2	94,5
	12-12	58,1	83,8	96,8
1951	16-1	63,6	71,8	98,9
	13-2	62,3	67,3	98,9
	9-3	63,2	65,8	95,6
	3-4	63,4	66,6	97,6
	10-5	62,2	67,7	97,1
	6-6	66,7	61,1	97,9
	4-7	61,8	59,3	98,8
	18-8	60,0	66,0	100,7
	15-9	57,2	71,2	99,2
	16-10	58,7	74,5	96,3
1952	8-1	61,6	68,6	99,6
	12-2	61,7	69,5	100,1
	18-3	58,5	70,5	96,9
	24-4	60,5	73,6	99,6
	12-6	62,9	62,7	97,1
	16-7	59,9	69,6	98,7
	28-8	60,2	73,0	97,3
	17-9	57,5	72,5	98,4
	28-10	55,2	75,0	97,6
	20-11	54,7	81,0	98,1
1953	6-1	62,5	73,6	99,9
	6-2	65,0	67,9	98,9

1 p. 100, de l'acide *trans*, 16 — octadécénoïque, dont la présence pourrait perturber légèrement les résultats si cet acide « passait » avec les acides solides.

III. — Résultats

Les résultats de l'analyse des échantillons de beurre sont portés dans les tableaux 14, 15 et 16 et sur les figures 13 et 14.

Le taux d'acide vaccénique varie au cours de l'année. En moyenne ce taux est

de 1,2 pour le beurre fabriqué à Riedseltz et de 2,0 pour le beurre fabriqué à Bayeux. Si, sur le beurre fabriqué en Alsace, on considère séparément la période d'alimentation « en vert » et la période de stabulation comptée de décembre à avril, on trouve respectivement pour les deux périodes les taux suivants : 1,3 et 1,0. Ainsi le taux d'acide vaccénique est plus faible en Alsace qu'en Normandie et, en Alsace, il est plus faible

TABLEAU 15

Séparation des acides « solides » et « liquides » Beurre de Riedseltz (Alsace)

Année	Date de fabrication	Indice d'iode du beurre	Indice d'iode des acides gras	Acides solides % acides totaux	Indice d'iode des acides solides
1949	14-10	37,6	41,3	40,4	0,6
	17-11	31,5	35,2	43,6	1,9
	28-12	30,9	34,6	43,5	0,6
1950	24- 1	28,6	32,3	42,1	0,6
	7- 3	30,4	34,1	41,2	1,5
	25- 4	32,8	36,5	39,9	1,7
	3- 6	38,2	40,9	39,4	5,2
	1- 7	39,1	41,8	32,0	3,5
	17- 8	39,4	44,0	36,5	3,7
	16- 9	40,7	45,2	37,2	2,7
	11-10	41,2	45,7	38,9	1,7
	9-11	33,7	37,6	45,6	4,8
	12-12	30,9	34,1	44,5	3,2
1951	16- 1	29,9	33,2	45,1	2,2
	13- 2	30,3	33,8	46,1	1,8
	13- 3	30,1	33,1	39,4	2,0
	6- 4	30,8	34,8	42,2	0,5
	10- 5	32,9	36,6	41,8	1,9
	31- 5	36,1	39,6	35,7	4,3
	4- 7	40,3	44,0	34,0	4,0
	31- 7	42,5	46,4	36,4	4,8
	18- 8	40,3	44,0	41,0	3,8
	15- 9	40,3	43,1	36,8	4,2
	11-10	36,9	41,2	41,5	2,9
	9-11	35,2	38,5	44,4	4,5
	4-12	29,8	33,0	45,1	5,0
1952	3- 1	30,3	34,0	46,3	3,0
	2- 2	31,5	35,5	46,0	1,2
	28- 2	32,0	35,0	48,3	
	8- 4	32,3	35,2	42,5	3,0
	15- 5	38,8	43,1	39,9	3,7
	12- 6	39,2	44,0	32,5	2,3
	8- 7	40,7	44,4	34,6	0
	2- 8	39,6	42,6	40,7	4,2
	11- 9	41,7	45,1	39,6	4,2
	17-10	39,6	42,9	44,1	4,0
	5-11	35,0	38,5	45,5	2,7
	10-12	32,3	35,8	44,9	2,0
1953	16- 1	30,6	35,2	44,2	2,3
	21- 2	30,6	34,3	47,0	2,3

TABLEAU 15 (suite)

Séparation des acides «solides» et «liquides» Beurre de Riedseltz (Alsace)

Année	Date de fabrication	Acides liquides % acides totaux	Indice d'iode des acides liquides	Acides solides + Acides liquides % acides totaux
1949	14-10	56,5	66,2	96,9
	17-11	52,0	61,5	95,6
	28-12	55,4	55,5	98,9
1950	24- 1	55,8	55,5	97,9
	7- 3	52,7	57,9	93,9
	25- 4	59,6	60,9	99,5
	3- 6	55,3	67,4	94,7
	1- 7	64,0	64,0	96,0
	17- 8	59,2	67,7	95,7
	16- 9	59,2	68,8	96,5
	11-10	56,8	73,2	95,7
	9-11	53,7	63,4	99,3
	12-12	52,1	71,4	96,6
1951	16- 1	53,7	60,7	98,8
	13- 2	52,7	57,4	98,8
	13- 3	59,2	54,3	98,6
	6- 4	56,2	55,8	98,4
	10- 5	55,4	63,8	97,2
	31- 5	62,3	62,2	98,0
	4- 7	66,0	—	100,0
	31- 7	61,0	68,7	97,4
	18- 8	58,3	72,2	99,3
	15- 9	60,4	71,5	97,2
	11-10	57,6	73,7	99,1
	9-11	54,0	67,0	98,4
	4-12	53,0	63,0	98,1
1952	3- 1	53,2	63,0	99,5
	2- 2	51,6	64,0	97,6
	28- 2	50,6	63,5	98,9
	8- 4	56,0	66,3	98,5
	15- 5	58,2	68,0	98,1
	12- 6	61,4	60,3	93,9
	8- 7	62,3	66,2	96,9
	2- 8	58,1	75,0	98,8
	11- 9	60,3	72,2	99,9
	17-10	55,6	72,4	99,7
	5-11	54,0	74,9	99,5
	10-12	52,0	70,8	97,0
1953	16- 1	55,5	61,5	99,7
	21- 2	55,0	61,7	102,0

pendant la période de stabulation que pendant le reste de l'année. Ceci rappelle les variations bien connues, concernant l'indice d'iode. Cependant, si l'on considère les figures 13 et 14 représentant respectivement les variations de l'indice d'iode du beurre et le taux d'acide vaccénique on constate que les courbes diffèrent. En effet

TABLEAU 16

Acide Vaccénique
Teneur exprimée en g p. 100 g d'acides gras totaux du beurre (Calculée à partir de l'indice d'iode des acides solides)

Mois	1949		1950		1951		1952		1953	
	Bayeux	Riedseltz	Bayeux	Riedseltz	Bayeux	Riedseltz	Bayeux	Riedseltz	Bayeux	Riedseltz
Janvier			1,6	0,3	2,2	1,1	1,3	1,6	2,7	1,1
Février					1,3	0,9	1,2	0,6	2,0	1,2
Mars			1,6	0,7	1,0	0,9	1,9			
Avril			2,4	0,8	0,8	0,2	3,5	1,4		
Mai			3,1	2,3	1,2	0,9		1,7		
Juin			3,1	2,3	2,2	1,7	2,4	0,8		
Juillet			2,5	1,3	2,6	1,5-2,0	1,1	0		
Août			2,0	1,5	0,8	1,2	1,9	1,2		
Septembre			1,5	1,1	2,6	1,7	2,0	1,9		
Octobre		0,3	0,8	0,7	3,0	1,4	2,8	1,2		
Novembre	2,3	0,9	3,2	2,6		2,2	3,2	1,5		
Décembre	1,6	0,3	3,1	1,6		2,5		1,0		

le taux d'acide vaccénique, tant en Normandie qu'en Alsace s'élève au printemps et à l'automne mais s'abaisse au milieu de l'été. Par ailleurs la valeur maximale du taux à l'automne se place le plus souvent après la rentrée à l'étable des vaches laitières, c'est-à-dire à une période où l'indice d'iode s'est déjà nettement abaissé.

IV. — Discussion

Tout porte à penser que l'acide vaccénique est formé au niveau du rumen.

BROUWER et JONKER-SCHAEFFENER (13) (1946) n'ont pas réussi à mettre en évidence la présence de l'acide vaccénique dans les acides gras de l'herbe et les analyses récentes confirment ce point (HARTMAN et *al.* (40), 1954 ; (41), 1956).

SHORLAND et *al.* (95) (1957) ont montré qu'au cours de l'hydrogénation atteignant les acides très insaturés de la ration, et plus particulièrement lorsque l'hydrogénation porte sur l'acide linoléique, on observe une production importante d'acide monoène à configuration *trans*. L'acide vaccénique pourrait avoir ici son origine. Cependant si l'hydrogénation tant biologique que chimique permet d'expliquer la présence de nombreux isomères monoènes en C₁₈, isomères de position et isomères stériques, (ALLEN et *al.* (1), 1955 ; ALLEN et KIESS (2), 1956 ; SREENIVASAN et *al.* (101), 1963), elle ne permet pas d'expliquer — ou elle ne suffit pas seule à expliquer — la formation préférentielle de l'isomère *trans*-11, compte tenu de la nature des acides sur lesquels porte l'hydrogénation (acide linoléique principalement, acide linoléique secondairement).

Ceci nous conduit à émettre l'hypothèse d'une origine bactérienne d'une partie au moins de l'acide vaccénique, origine déjà admise pour quelques autres acides gras du beurre (KEENEY et *al.* (55), 1962).

Les lactobacilles constituent une fraction importante de la flore du rumen (JENSEN et *al.* (52), 1956 ; PERRY et BRIGGS (80), 1959). Or HOFMANN (46) (1953) a montré qu'un acide monoène à 18 atomes de carbone dont la double liaison se place entre les carbones 11 et 12 (*cis*, 11-octadécénoïque) était le constituant insaturé majeur des lipides cellulaires des lactobacilles et sans doute aussi le précurseur de l'acide lactobacillique (*cis*-11, 12-méthylène-octadécénoïque) trouvé également dans les lipides des lactobacilles (HOFMANN, HENIS et PANOS (47), 1957). SCHEURBRANDT et BLOCH (89) (1962) ont établi que la double liaison de l'acide en C₁₈ monoène trouvé dans plusieurs microorganismes, parmi lesquels des lactobacilles, vivant en absence d'oxygène, était en 11, 12. Rappelons qu'O'LEARY (76) (1959) a montré que l'isomérisation de la double liaison de 9, 10 à 11, 12 pouvait être effectuée par certains microorganismes, dont *Lactobacillus arabinosus*, présent d'ailleurs dans la flore du rumen.

Des arguments existent donc en faveur de l'intervention d'un métabolisme bactérien pour expliquer la présence en quantité notable de l'acide vaccénique dans les acides gras du beurre. Mais l'ordre de succession des modifications de structure et leur site conduisant de l'acide linoléique ou d'un autre précurseur à l'acide vaccénique sont loin d'être parfaitement élucidés.

Nous avons vu que la teneur du beurre en acide vaccénique variait assez régulièrement avec la saison, tant en Normandie qu'en Alsace. On observe généralement un taux plus bas l'hiver mais on observe aussi une baisse régulière vers le début de l'été.

Si l'on s'appuie sur les arguments que nous venons de développer relatifs à l'origine de l'acide vaccénique, deux explications pourraient être fournies : une modification saisonnière de la flore du rumen — idée déjà émise par WRIGHT (1113) (1960) — ou une modification saisonnière du substrat autrement dit du taux d'acide linoléique de la ration ou peut-être les deux modifications à la fois. En ce qui concerne le taux d'acide linoléique dans la ration il est certain qu'il est plus faible pendant la période de stabulation que pendant la période de pâturage.

Pendant la période de pâturage, lorsque la ration alimentaire des vaches laitières est constituée uniquement par l'herbe ou les fourrages verts, une étude de la composition de la fraction lipidique de l'herbe ou des fourrages réellement consommés par les vaches laitières devrait permettre de connaître s'il y a ou non modification au niveau du taux d'acide linoléique de la ration.

Nous trouverons dans la 2^e partie de cette étude quelques éléments de réponse à cette question.

INTRODUCTION

DEUXIÈME PARTIE

LA RÉPERCUSSION DE LA CONSTITUTION DES LIPIDES ALIMENTAIRES SUR LES LIPIDES DU BEURRE

INTRODUCTION

Pendant la période de pâturage l'herbe des prairies peut constituer dans certaines régions, la seule source de lipides alimentaires, mais en période de stabulation, ceux-ci proviennent d'aliments variés : foin, ensilage, betteraves et concentrés divers tels que des tourteaux (résidus d'extraction des huiles végétales, plus ou moins délipidés) ou des mélanges variés à base de céréales.

Dans cette seconde partie les résultats de l'analyse des lipides des végétaux, aliments des vaches laitières, sont confrontés avec les résultats de l'analyse des lipides du beurre. Il ne s'agit pas simplement de les comparer mais bien de mettre en évidence, d'établir une relation de cause à effet entre les lipides de l'aliment et ceux du beurre, ou plus exactement entre les acides gras de l'aliment et ceux du beurre.

D'une façon très générale les acides gras des aliments énumérés sont riches en acides polyinsaturés. L'acide linoléique est le constituant majeur des acides gras de l'herbe et des fourrages (SMITH et CHIBNALL (96), 1932 ; HILDITCH (44), 1947 ; SHORLAND (90), 1953 ; GARTON (30), 1960 ; HAWKE (42), 1963), et l'acide linoléique le constituant principal des lipides des céréales (FISCHER (26), 1960). Or nous connaissons les très faibles proportions de ces mêmes acides dans le beurre. Les modifications atteignant, dans l'organisme animal, les acides gras alimentaires sont donc très importantes et les processus qui interviennent méritent d'être étudiés de manière approfondie.

Mais l'étude de la constitution en acides gras des fourrages ou de l'herbe de prairie n'est qu'un aspect de la connaissance des lipides de ces végétaux. En effet des études récentes (WEENINK (109), 1961 ; SHORLAND (91), 1961) ont montré la complexité des lipides des fourrages, mettant en évidence divers types de lipides parmi lesquels une proportion élevée de « glucido-lipides ». L'étude des acides gras sur un matériel végétal devrait donc être poursuivie non seulement *in toto* mais après la séparation des divers types de lipides dans lesquels les acides gras sont intégrés. Cependant la présence de plusieurs variétés dans l'herbe de prairie rend celle-ci mal adaptée à une telle étude. Aussi avons nous appliqué les techniques nouvelles de fractionnement et d'identification des lipides à une variété de fourrage, très généralement distribuée en France aux vaches laitières et qui n'a pas fait l'objet d'études antérieures similaires : la Luzerne (*Medicago sativa*). Notre étude a porté sur la variété « Luzerne Flamande », et est présentée dans le chapitre I de cette seconde partie.

La constitution en acides gras de l'herbe de prairie et sa répercussion sur celle des acides gras du beurre est étudiée dans le chapitre II. Dans ce chapitre nous avons voulu démontrer l'existence d'une relation quantitative entre certains acides gras de la ration et du beurre.

Enfin dans le chapitre III, nous présentons les modifications dans la constitution en acides gras du beurre en fonction des lipides de tourteaux et concentrés distribués aux vaches laitières sous forme de suppléments alimentaires. Les expériences portent sur des tourteaux gras de coprah, de lin et de soja, et sur un concentré enrichi en suif.

CHAPITRE I

LES ACIDES GRAS DE LA LUZERNE FLAMANDE

I. — Introduction

Les acides gras se trouvent associés à divers types de lipides dont certains sont depuis longtemps connus, tels les cires, les phosphatides, les glycérides. Il a été récemment montré (WEENINK (108), 1959 ; GARTON (30), 1960 ; WEENINK (109), 1961 ; SHORLAND (91), 1961), qu'une partie importante de la fraction lipidique soluble dans l'acétone des fourrages, était constituée principalement par un lipide complexe formé par l'association des composés suivants : acides gras, glycérol, sucre ; les glycérides constituant pondéralement une fraction peu importante de la fraction soluble dans l'acétone. Un tel composé appelé par CARTER et *al.* (14) (1956) « lipocarbohydre », que nous pourrions donc appeler « glucido-lipide », serait actuellement classé dans le groupe des « gluco-lipides ». CARTER et *al.* (14) (1956), ayant découvert ce composé dans les lipides de la farine de blé se préoccupèrent d'identifier la fraction glucidique. Ils mirent en évidence la présence de galactose et de glycérol et étudièrent la structure du composé galactosyl-glycérol. Le glucido-lipide est donc dans ce cas un ester d'acide gras et de galactosyl-glycérol.

WEENINK (109) (1961) et SHORLAND (91) (1961) identifièrent dans les lipides du Trèfle Rouge (*Trifolium pratense*) et du Ray-grass (*Lolium perenne*) une fraction lipidique analogue, ou galacto-lipide. Ces auteurs remarquèrent, et ce point nous intéresse particulièrement, que les acides gras de cette fraction contenaient une proportion très importante d'acide linoléique : 95 ou 88 p. 100 selon WEENINK (109) ou SHORLAND (91). Dans les glycérides ou dans les acides gras libres de ces extraits lipidiques de fourrage, la proportion d'acide linoléique est voisine seulement de 40 ou 50 p. 100. L'existence de galactolipides dans l'herbe ou les fourrages revêt une certaine importance lorsque l'on se préoccupe de problèmes relatifs à l'origine des acides gras du lait. En effet d'une part, les galactolipides seraient hydrolysés par les bactéries du rumen plus facilement que les glycérides (WRIGHT (114), (1961) — l'association glucides-lipides crée en effet une polarité qui ne doit pas être étrangère à une action favorable des systèmes enzymatiques — et par ailleurs la concentration en acide linoléique étant très élevée dans la fraction galactolipidique l'hydrolyse au niveau du rumen que l'on sait importante (GARTON et *al.* (34), 1961) libère rapidement une grande quantité d'acide linoléique, point essentiel de l'alimentation à l'herbe des vaches laitières.

Il nous a semblé intéressant de poursuivre une étude semblable sur des fourrages habituellement distribués en France aux vaches laitières. Nous avons donc étudié la composition des acides gras des diverses fractions lipidiques de la Luzerne Flamande.

II. — Matériel et méthodes

A. — PRÉPARATION DE L'ÉCHANTILLON ET EXTRACTION

La luzerne sur laquelle a porté l'analyse a été semée le 30 avril 1962. Elle a subi une première coupe le 24 juillet 1962 et a été à nouveau coupée le 3 novembre 1962 pour fournir une botte constituant l'échantillon sur lequel porte l'analyse dont nous présentons ci-après les résultats. La plante très feuillue avait des tiges hautes de 40 cm.

Cette luzerne fut conservée à -20°C . Pour l'analyse on prélevait un échantillon d'environ 500 g, que l'on découpait aux ciseaux en fragments de 1 à 2 cm. L'herbe était lyophilisée, puis broyée. La poudre obtenue était placée à la glacière.

Un poids voisin de 15 g était mélangé à son poids de sable et extrait par un solvant composé de 100 parties d'éther de pétrole (40-60°) et de 10 parties d'alcool éthylique (v/v), dans un appareil d'extraction continue pendant 16 heures.

Sur l'extrait obtenu on procéda à l'étude des acides gras des diverses fractions lipidiques par deux voies différentes. La première voie consiste en une étude classique comportant une séparation en fraction soluble et fraction insoluble dans l'acétone, une dialyse de la fraction soluble, suivie d'une saponification au niveau des différentes fractions obtenues et extraction des acides gras. Cette méthode analytique est à peu de chose près celle indiquée par SHORLAND (91) (9161). Dans la seconde voie, des techniques récentes d'analyses ont été utilisées : principalement la chromatographie en couche mince et la spectrophotométrie infrarouge.

La chromatographie sur couche mince a de plus été à maintes reprises utilisée comme test de contrôle à différents stades de l'analyse par voie classique.

Nous décrirons en détail les deux procédés analytiques utilisés.

B. — ÉTUDE ANALYTIQUE CLASSIQUE

a) *Séparation des fractions acétone soluble et acétone insoluble*

Après évaporation du solvant, la fraction soluble dans l'acétone était séparée de la fraction insoluble par deux cristallisations successives à 0°C pendant 15 heures. La fraction soluble dans l'acétone a été principalement étudiée. Après évaporation de l'acétone et pesée, cette fraction est reprise par l'éther de pétrole (15 ml) et soumise à la dialyse,

b) *Dialyse*

Le produit placé dans une pochette en caoutchouc (gant de chirurgien) a dialysé pendant un temps variable, mais généralement voisin de 15 heures, avec 15 renouvellements de 100 ml de solvant pur. La progression de la dialyse a été contrôlée par chromatographie sur couche mince.

c) *Saponification et extraction des acides gras* α) *Fraction dialysable.*

Extraction des acides libres. — Après évaporation du solvant et pesée, on a dissous la fraction dialysable dans un volume voisin de 50 ml d'éther de pétrole, la fraction a été lavée deux fois par 15 ml d'un mélange en parties égales d'une solution aqueuse de carbonate de potassium à 5 p. 100 et d'alcool éthylique. Après acidification de la solution hydroalcoolique de savons, les acides gras sont extraits par l'éther de pétrole, puis pesés après évaporation du solvant.

Fraction neutre. — Après évaporation du solvant la fraction neutre a été saponifiée par 10 ml de potasse alcoolique 0,5 N, pendant deux heures à 85°C. La solution de savons a été ensuite amenée à pH neutre (avec HCl N/1) puis ajustée en solution d'hydroxyde de potassium N/10 et alcool 50 p. 100. L'insaponifiable a été extrait à l'éther de pétrole, par trois extractions successives, les savons ont été acidifiés par HCl au 1/3 et les acides libérés extraits à l'éther de pétrole et pesés après évaporation du solvant.

 β) *Fraction non dialysable.*

La fraction non dialysable a été saponifiée dans les mêmes conditions que la fraction neutre dialysable. Après extraction de l'insaponifiable, les acides gras ont été libérés et extraits à l'éther de pétrole.

d) *Préparation des esters méthyliques*

Les acides gras libres et les acides gras de la fraction neutre dialysable ainsi que les acides gras de la fraction non dialysable ont été estérifiés par l'alcool méthylique en présence d'acide sulfurique utilisé comme catalyseur. Après refroidissement et addition de carbonate de sodium à 5 p. 100, les esters ont été extraits par le pentane.

e) *Analyse par chromatographie en phase gazeuse*

Après évaporation presque totale du pentane, les esters ont été analysés. Les chromatogrammes obtenus à la sensibilité maximum de l'appareil (Aerograph modèle 110 C, WILKENS, Californie) proviennent d'une quantité variable d'esters, de 1 à 10 μ l. La colonne utilisée était constituée par un support de « chromosorb » chargé à 20 p. 100 de succinate de diéthylène glycol. Longueur : 3,048 m (10 pieds) diamètre 0,8 mm (1/4 de pouce) ; gaz vecteur : hélium.

L'identification des acides gras est effectuée par la détermination du logarithme du temps de rétention à débit constant, sur les différents chromatogrammes, et également par l'utilisation d'esters d'acides purs de référence.

Les proportions relatives des divers acides gras sont obtenues en utilisant les mesures données par l'intégrateur monté sur l'enregistreur, à partir de divers chromatogrammes obtenus avec des quantités variables du mélange d'esters, dans les mêmes conditions de sensibilité.

C. — ÉTUDE ANALYTIQUE UTILISANT LA CHROMATOGRAPHIE DE
PARTAGE SUR COLONNE ET COUCHE MINCE, ET LA
SPECTROPHOTOMÉTRIE INFRA-ROUGE

a) *Chromatographie*

La chromatographie sur colonne a été effectuée selon la technique de HIRSCH et AHRENS (45) (1958), utilisant un support d'acide silicique et un solvant de développement constitué par un mélange d'éther de pétrole et d'éther éthylique, ce dernier en proportion croissante.

Cette méthode a été cependant peu utilisée ; la technique de chromatographie sur plaque, en couche mince s'étant révélée mieux adaptée à notre travail.

On a essentiellement appliqué la méthode de MANGOLD (70) (1961), qui permet de séparer les diverses fractions lipidiques d'un mélange biologique complexe. Ces fractions sont par ordre de polarité croissante : les pigments caroténoïdes, les esters de stérol, les triglycérides, les acides gras libres, les glycérides partiels (di et mono). Enfin des composés plus polaires tels que seraient les galactolipides ou les phosphatides.

Les plaques utilisées étaient de 20 sur 20 cm. Le dépôt de silica gel G avait une épaisseur de 250-275 μ . La quantité déposée était d'environ 10 μ l d'une solution au 1/10^e pour une tache, et de 200 μ l lorsqu'on désirait obtenir des bandes. Le solvant de développement utilisé a été principalement le mélange éther de pétrole, éther éthylique, acide acétique (70/40/1). Les proportions ont été élevées à 50/50/1 en vue de la séparation des fractions les plus polaires mal séparées et recueillies ensemble au cours d'une première chromatographie.

L'extrait éthéré d'herbe étant pigmenté naturellement, des taches apparaissent sur le chromatogramme avant toute révélation. Les fractions lipidiques qui nous intéressaient en premier lieu ont été révélées par les vapeurs d'iode : la plaque restant exposée sous une cloche en verre à côté de quelques cristaux d'iode. On a effectué la récupération des fractions séparées. Les produits ont été séparés du support inerte par plusieurs extractions suivies de centrifugation. Après évaporation du solvant les produits obtenus ont été étudiés par spectrophotométrie infra-rouge.

b) *Spectrophotométrie infra-rouge*

L'appareil utilisé était un spectrophotomètre Perkin Elmer, modèle 21, à double faisceau et à prisme de chlorure de sodium.

Les produits recueillis après chromatographie sur couche mince ont été étudiés soit sous forme de film entre deux lamelles de chlorure de sodium dont l'épaisseur était généralement de 0,025 mm, soit en solution dans le tétrachlorure de carbone, en cellule de 0,1 mm d'épaisseur, avec compensation par le tétrachlorure de carbone en cellule identique.

Les spectres étaient comparés à des spectres obtenus à partir de produits définis

III. — Résultats

A. — RÉSULTATS DE L'ÉTUDE ANALYTIQUE CLASSIQUE

L'extrait éthéré représente en moyenne 5,3 p. 100 de l'extrait sec de luzerne (5,18-5,23-5,55-5,54-5,05-4,48). A partir de cet extrait éthéré on a procédé à l'analyse selon la méthode décrite. La fraction soluble dans l'acétone a été soumise à la dialyse. Celle-ci a été contrôlée par chromatographie sur couche mince comme le montre la figure 15.

TABLEAU 17

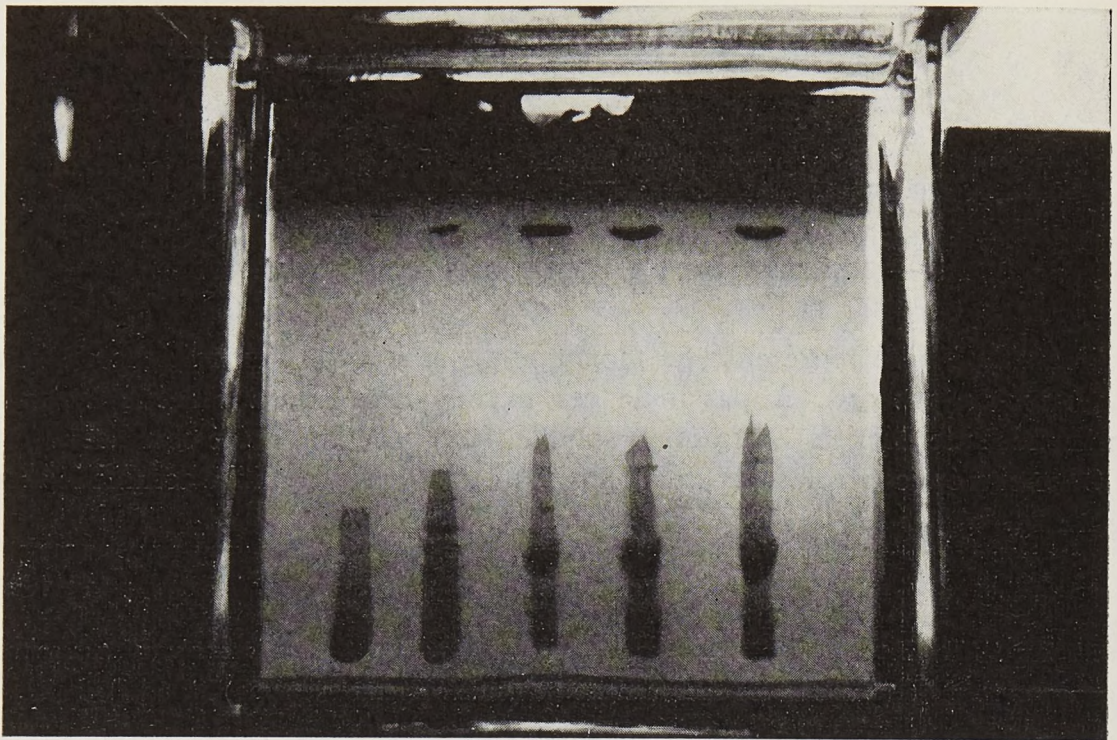
Étude des lipides de la Luzerne (Medicago sativa) Déroulement de trois analyses successives
(Les chiffres indiquent le poids de substance en mg)

Les différentes fractions	1 ^{ère} analyse (A)	2 ^e analyse (N)	3 ^e analyse (X)
Matière sèche	14 100	14 100	14 330
Extrait éthéré	782	784	643
Insoluble dans l'acétone	242	258	241
Soluble dans l'acétone	503	480	389
Perte à la précipitation à l'acétone	37	46	13
Fraction dialysable	223	218	176
Fraction non-dialysable	228	213	169
Perte à la dialyse	52	49	44
Acides gras libres	31	22	20
Acides gras fraction dialysable (neutre)	38	31	32
Acides gras fraction non-dialysable	61	60	75
Total des acides gras	130	113	127
Insaponifiable fraction dialysable	86	78	92
Insaponifiable fraction non-dialysable	18	13	21
Insaponifiable total	104	91	113

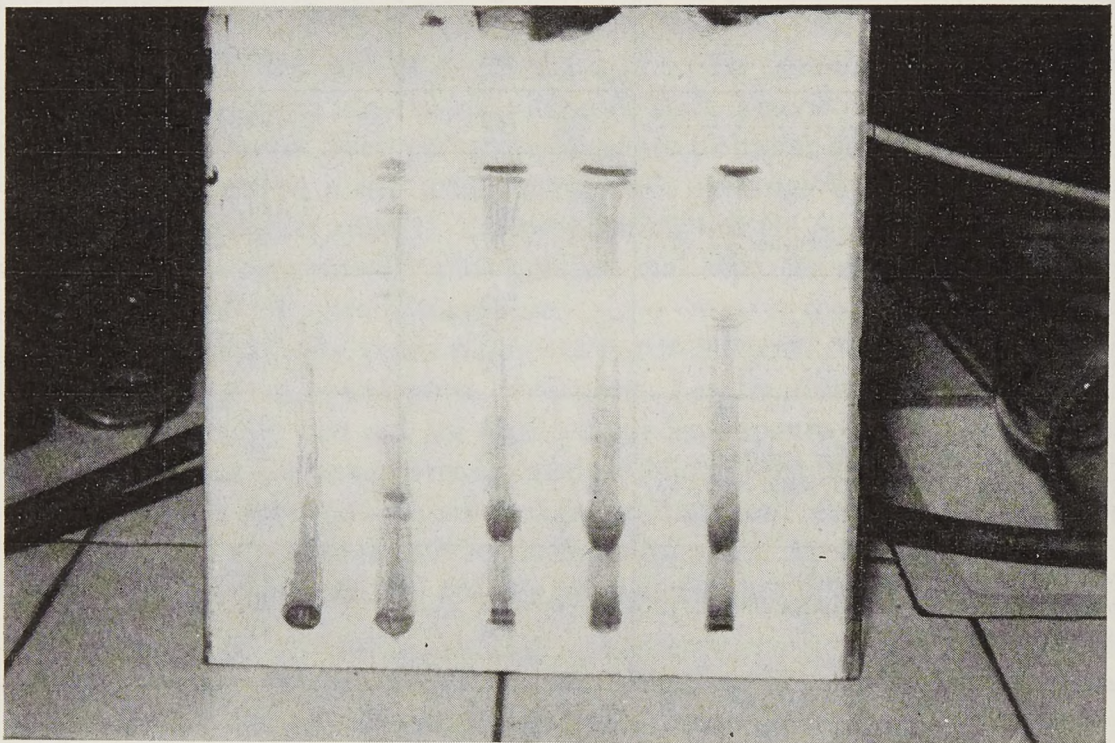
Les conditions expérimentales ont été les mêmes pour les trois analyses successives dont les résultats sont rapportés ci-dessous. La figure 16 montre comment se présentent les fractions dialysable et non dialysable une fois la dialyse terminée.

Le tableau 17 permet de suivre le déroulement de l'analyse. On a porté dans ce tableau les chiffres bruts obtenus, en indiquant les pertes entre chaque opération (précipitation à l'acétone, dialyse). Ces pertes sont constituées par des fractions restant fixées sur les parois des ballons malgré des rinçages répétés ou lors de la dialyse, sur les parois de la membrane de caoutchouc.

Les pigments chlorophylliens restèrent présents tout au long de l'ana-



B₁ B₂ A₁ A₂ T
Avant révélation à l'iode.



B₁ B₂ A₁ A₂ T
Après révélation à l'iode.

FIG. 15. — *Étude de la dialyse de la fraction soluble dans l'acétone des lipides de la luzerne*

De gauche à droite : B₁, B₂, A₁, A₂, T.

La dialyse de la fraction acétone soluble étant terminée, on chromatographie les fractions non dialysable (B₁) et dialysable (B₂).

La dialyse étant en cours, on chromatographie la fraction déjà dialysée (A₁) et la fraction restant encore soumise à la dialyse (A₂).

Enfin le chromatogramme de droite (T) correspond à la fraction totale soluble dans l'acétone (avant dialyse).

Solvant : éther de pétrole : éther sulfurique : acide acétique (70 : 40 : 1).

Révélateur : Vapeurs d'iode.

On voit que la fraction très polaire et très colorable à l'iode est progressivement isolée.

Photo supérieure : avant révélation à l'iode.

Photo inférieure : après révélation à l'iode.

lyse se repartissant entre les différentes fractions. Les acides gras et les fractions insaponifiables en étaient cependant pratiquement dépourvus.

Nous n'avons pas trouvé de technique d'extraction sélective de ces pigments dont la polarité est intermédiaire entre celle des glycérides et celle de la fraction très polaire qui nous intéresse.

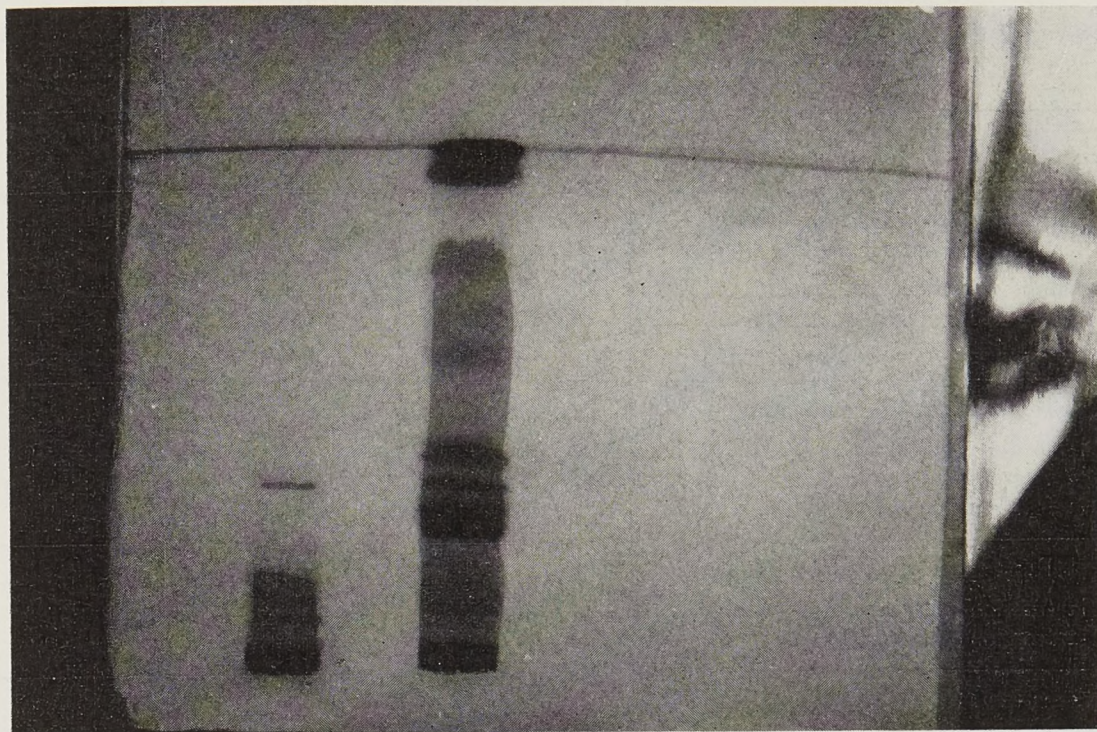


FIG. 16. — *Les lipides de la uzerne. Fraction soluble dans l'acétone*

1) à gauche fraction non dialysable

2) à droite fraction dialysable

Solvant : éther de pétrole : éther sulfurique : acide acétique (70 : 40 : 1)

Révélateur : vapeurs d'iode

Durée (de montée du solvant) : 45 minutes

On distingue dans la fraction dialysable, les pigments caroténoïdes au niveau du front du solvant, fortement colorés par l'iode

Les glycérides et les acides gras libres se situent entre la fraction de tête et la zone centrale du dialysable (épaisse bande noirâtre)

La fraction non dialysable comporte une fraction très polaire, très colorable à l'iode, située à la base du chromatogramme — que l'on identifie au galactolipide — et diverses bandes dues aux pigments

Dans le tableau 18 les chiffres bruts ont été repris afin de déterminer en pourcentage l'importance relative des différentes fractions lipidiques et l'importance relative des différents composés (acides gras, matière insaponifiable) dans ces différentes fractions.

Au cours de la précipitation à l'acétone, les cires et phosphatides restent dans la fraction insoluble. Celle-ci représente environ 1/3 de l'extrait étheré. Elle contient une proportion notable d'acides gras, éléments constitutifs des cires et phosphatides. Cette fraction n'a pas été étudiée dans le présent travail.

La fraction soluble dans l'acétone contient les lipides qui nous intéressent : glycérides et glucido-lipides. Ces derniers restent dans la fraction non dialysable avec une proportion notable d'insaponifiable, dont la composition n'a pas été déterminée.

TABLEAU 18

Répartition des acides gras et de l'insaponifiable dans les différentes fractions lipidiques de la Luzerne (Medicago sativa) (p. 100)

Répartition	1 ^e analyse (A)	2 ^e analyse (N)	3 ^e analyse (X)
Extrait étheré en % matière sèche.....	5,55	5,54	4,48
Répartition de l'extrait étheré (en % extrait étheré)			
Soluble dans l'acétone	64,3	61,3	60,5
Insoluble dans l'acétone	31,0	33,0	37,5
Perte	4,7	5,7	2,0
Répartition des acides gras			
Dans les acides gras libres	23,6	19,3	15,9
Dans la fraction dialysable neutre	29,0	27,4	25,1
Dans la fraction non-dialysable	47,4	53,3	59,0
Répartition de l'insaponifiable			
Dans la fraction dialysable	82,5	85,4	81,6
Dans la fraction non dialysable	17,5	14,6	18,4
Acides gras en p. 100 de la fraction soluble dans l'acétone	25,8	23,6	32,8
Insaponifiable en p. 100 de la fraction soluble dans l'acétone	20,6	19,0	29,0

La proportion d'acide gras par rapport à la fraction soluble dans l'acétone est relativement faible (voisine de 25-30 p. 100). La proportion de matière insaponifiable est voisine de la proportion d'acides gras.

On a déterminé la composition des différents mélanges d'acides gras, répartis dans les différentes fractions. Les résultats sont portés dans le tableau 19.

On remarque de suite la différence de composition. Ainsi les acides gras de la fraction non dialysable comptent seulement 4 acides dont le taux est supérieur à 1 p. 100 ce qui, lorsque l'analyse en phase gazeuse est effectuée à une échelle relativement petite, pourrait laisser croire à la présence de ces seuls acides. En fait si l'analyse est effectuée de façon à faire apparaître nettement les acides dont le taux est inférieur à 1 p. 100, on trouve peu de différence dans le nombre et la nature des acides gras de chacune des fractions : non-dialysable, dialysable (fraction neutre et acides libres). Cependant la plus grande variété d'acides gras existe incontestablement dans la fraction acides libres. Dans cette fraction seulement, on rencontre des acides dont le nombre d'atomes de carbone est inférieur à C_{12} et également des acides à haut poids moléculaire (C_{22} , C_{24}). On relève une différence très importante au niveau des proportions relatives des acides gras de l'une à l'autre fraction : dialysable, non-dialysable

TABLEAU 19

Proportions relatives des acides gras dans les différentes fractions de la Luzerne (Medicago sativa)
 (Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras.
 Résultats exprimés en p. 100 de la surface du chromatogramme)

Dénomination des acides	Dialysable		Non-dialysable
	Acides gras libres	Fraction neutre	
8:0	tr	0,2	—
10:0	tr	0,5	—
11:0	tr	—	tr
12:0	1,3	4,6	0,2
12:1	tr	—	—
13:0 + 13:0	1,1	—	—
14:0	2,3	4,2	0,4
15:0	1,3	0,8	0,2
i 16:0	tr	0,8	tr
16:0	20,1	11,4	10,3
16:1	1,3	1,4	0,4
17:0	0,6	2,2	0,3
17:1		tr	tr
18:0	7,2	3,6	1,8
18:1	5,9	6,9	0,6
18:2	20,5	22,6	10,0
18:3	34,3	40,8	75,8
22:0	1,3		
24:0	2,8		

et acides libres. L'acide linolénique représente près de 75 p. 100 des acides de la fraction non-dialysable, comme on le voit nettement sur la figure 17 alors que le taux de cet acide atteint seulement 40 p. 100 environ dans les graisses neutres et les acides

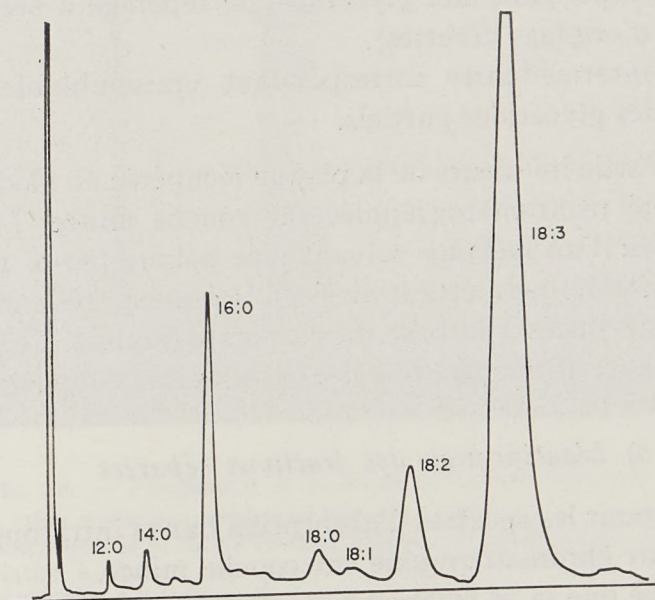


FIG. 17. — Chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras de la fraction non dialysable des lipides de la luzerne, (fraction soluble dans l'acétone)

libres de la fraction dialysable. Le taux d'acide palmitique par contre est plus élevé dans la fraction « acides libres » que dans les deux autres fractions.

Par ailleurs on a déterminé la composition des acides totaux de la luzerne. On note que les proportions des différents acides gras trouvés dans les acides totaux, sont intermédiaires entre les proportions trouvées dans les différentes fractions lipidiques solubles, dans l'acétone, à l'exception du taux d'acide palmitique qui est supérieur dans la luzerne totale. Il convient de rappeler que les acides gras de la fraction insoluble dans l'acétone n'ont pas été étudiés.

B. — RÉSULTATS DE L'ÉTUDE ANALYTIQUE UTILISANT LA
CHROMATOGRAPHIE DE PARTAGE SUR COLONNE ET SUR
COUCHE MINCE ET LA SPECTROPHOTOMÉTRIE INFRAROUGE

La technique de chromatographie sur couche mince a été utilisée après plusieurs essais infructueux sur colonne. En effet, la méthode de séparation sur colonne d'acide silicique s'est montrée peu sélective pour les diverses fractions lipidiques de la luzerne. Au cours de l'élution, en particulier, on observe un chevauchement des fractions qui rend difficile une séparation convenable des composants. On a donc rapidement utilisé la chromatographie sur couche mince dans laquelle les problèmes d'élution ne se posent pas.

a) *Séparation des composés par chromatographie
sur couche mince*

La chromatographie a été appliquée à la fraction soluble dans l'acétone. On a utilisé le dépôt en bande continue en vue d'augmenter la quantité déposée. Un « cache » a permis le repérage des taches sur le côté du chromatogramme.

On a ensuite récupéré dans d'assez bonnes conditions les diverses fractions séparées. Par additions successives de solvant au support inerte suivies de centrifugations, on a réussi à obtenir les fractions suivantes :

- une fraction contenant le carotène,
- une fraction correspondant aux glycérides (le repérage a été effectué au moyen de triglycérides d'origines diverses),
- deux fractions intermédiaires correspondant vraisemblablement à des acides gras libres et à des glycérides partiels.

Enfin toute la partie inférieure de la plaque récupérée en bloc a donné la fraction F_1 , qui a ensuite été rechromatographiée sur couche mince. Le développement a été effectué au moyen d'un mélange solvant plus polaire (80 p. 100 éther éthylique, 20 p. 100 éther de pétrole) permettant ainsi un isolement très satisfaisant de la fraction colorable à l'iode située à la base du chromatogramme. Celle-ci a été recueillie et nommée I_a . La figure 18 montre une image de ce développement.

b) *Identification des fractions séparées*

On a tenté d'obtenir les spectres d'absorption dans l'infrarouge de ces différentes fractions séparées par chromatographie sur couche mince.

On a ainsi vérifié que la 2^e fraction recueillie correspondait bien à des triglycérides par comparaison à divers spectres obtenus à partir de glycérides connus.

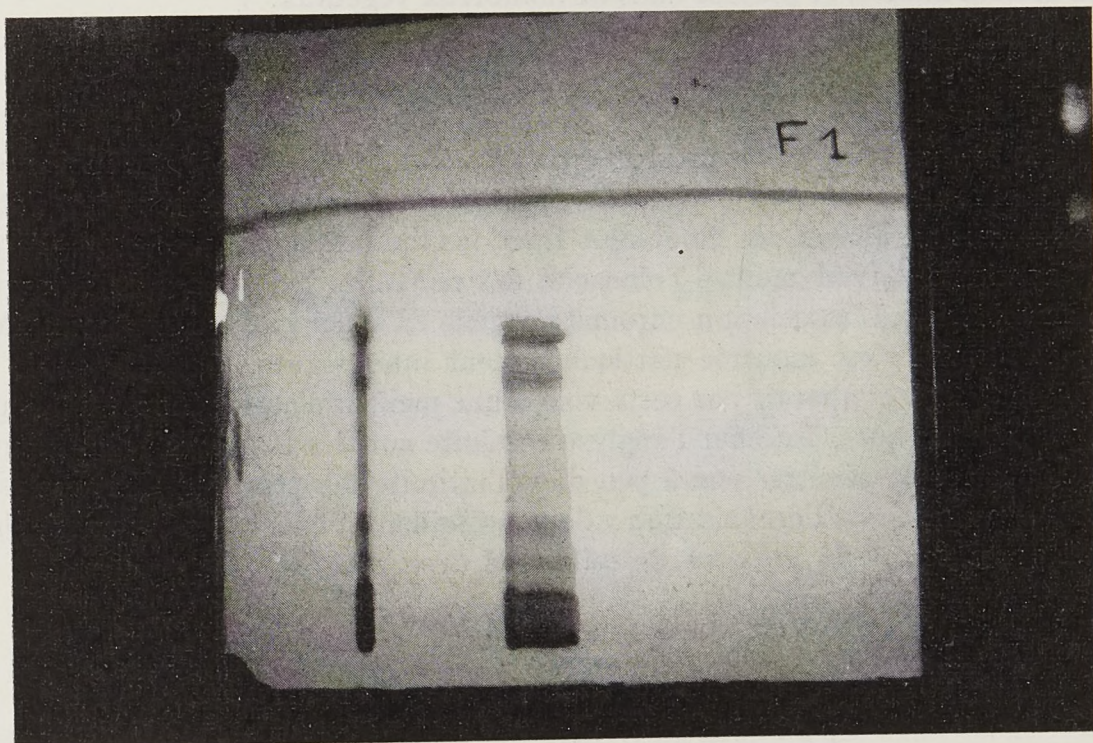
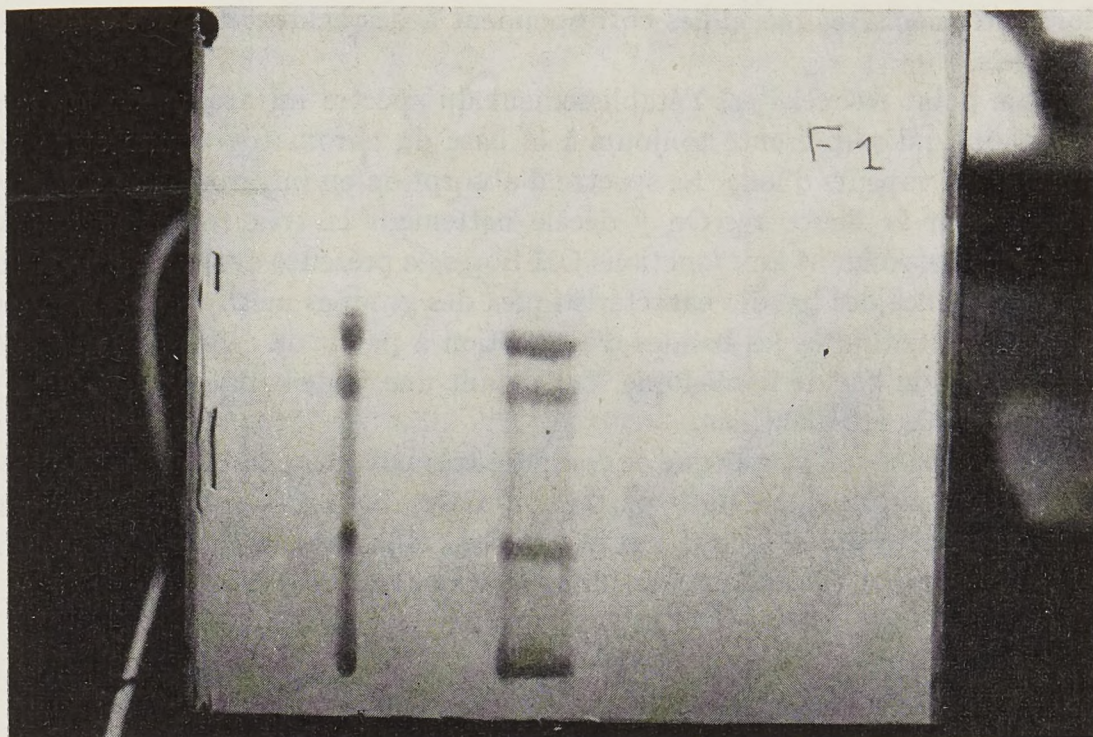


FIG. 18. — Purification de la fraction (F_1) non dialysable

Solvant : éther de pétrole, éther sulfurique, acide acétique (20 — 80 — 1)

Photo supérieure : Chromatoplaque de la même fraction déposée en quantité plus ou moins grande et photographiée avant révélation à l'iode.

On distingue les fractions colorées naturellement

Photo inférieure : Même chromatoplaque après exposition aux vapeurs d'iode.

On distingue la fraction très polaire, très colorable à l'iode, identifiée au galactolipide, qui sera recueillie séparément et constituera la fraction 1a.

Il semble que l'on puisse affirmer, par l'examen des spectres infrarouges que les fractions intermédiaires recueillies correspondent à des acides libres et à des glycérides partiels.

Mais le point essentiel est l'établissement du spectre infrarouge de la fraction I_a très polaire qui se présente toujours à la base du chromatogramme et se colore en brun par les vapeurs d'iode. Le spectre d'absorption en infrarouge de ce composé est présenté sur la figure 19. On y décèle nettement la très forte absorption à $3\,300\text{ cm}^{-1}$ correspondant aux fonctions OH libres, la présence des bandes ester ($1\,730\text{ cm}^{-1}$) et l'existence des bandes caractéristiques des groupes méthylène ($2\,900\text{ cm}^{-1}$).

On a identifié toutes les bandes d'absorption à partir de celles de la glycérine, du galactose et de l'acide linoléique. Cependant une forte bande d'absorption vers $1\,580\text{ cm}^{-1}$ n'a pas été identifiée.

On peut cependant penser que ce composé très polaire, colorable à l'iode, constituant la fraction principale de la partie non-dialysable est bien le composé correspondant au galacto-lipide trouvé par WEENINK (109) dans le Trèfle Rouge (*Trifolium pratense*) et par SHORLAND (91) dans le Ray-grass.

IV. — Discussion

Le composé, ester d'acides gras et de galactosyl-glycérol serait donc très répandu dans la nature, et présent dans de nombreux végétaux.

Intérêt des méthodes analytiques utilisées

L'analyse que nous avons présentée est du point de vue analytique moins complète que celle de WEENINK (109) (1961), puisqu'elle a eu surtout pour but l'étude des acides gras au niveau des différentes fractions lipidiques séparées mais elle présente l'avantage d'avoir montré l'efficacité des nouvelles techniques de séparation et d'identification. L'association chromatographie en couche mince et spectrophotométrie infrarouge s'est montrée particulièrement intéressante.

On peut espérer aboutir par cette voie à une meilleure compréhension des phénomènes biochimiques. En effet l'analyse conduite sur des fractions préalablement séparées permet de pénétrer peu à peu dans l'intimité des structures en analysant sans désorganiser ; or « l'organisation » dans les milieux biologiques est aussi, sinon plus, importante que la présence de tel ou tel composé.

Les différentes fractions lipidiques. Leur signification biologique

La répartition en poids des différentes fractions séparées, telle qu'elle apparaît à la lecture du tableau 18 révèle quelques différences par rapport aux résultats analytiques obtenus par WEENINK (109) (1961) ou SHORLAND (91) (1961), respectivement sur le Trèfle Rouge et le Ray-grass. Ces auteurs trouvent que la fraction non-dialysable est environ trois fois plus importante que la fraction dialysable alors qu'au cours des analyses que nous rapportons, les deux fractions sont pratiquement équivalentes.

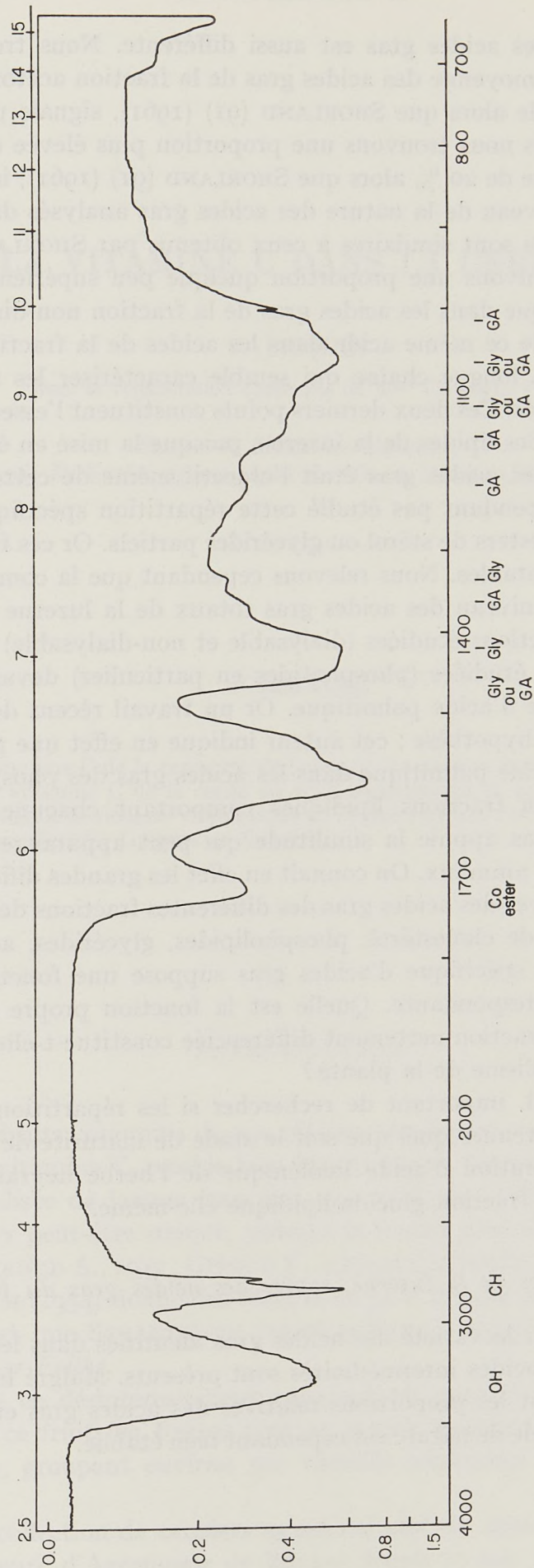


FIG. 19. — Spectre infrarouge de la fraction Ia. (Galactolipide?)

La répartition des acides gras est aussi différente. Nous trouvons seulement 53 p. 100 environ en moyenne des acides gras de la fraction acétone soluble dans la fraction non-dialysable alors que SHORLAND (91) (1961), signale une proportion de 75 p. 100. Par ailleurs nous trouvons une proportion plus élevée d'acides gras sous forme libre : de l'ordre de 20 % alors que SHORLAND (91) (1961), indique 6,5 p. 100.

Cependant au niveau de la nature des acides gras analysés dans les différentes fractions, nos résultats sont similaires à ceux obtenus par SHORLAND (91) ou WEENINK (109). Nous trouvons une proportion quelque peu supérieure à 75 % (75,3-76,3) d'acide linoléique dans les acides gras de la fraction non-dialysable, et seulement 40 % environ de ce même acide dans les acides de la fraction dialysable. La présence des acides à longue chaîne qui semble caractériser les acides gras libres est également confirmée. Ces deux derniers points constituent l'essentiel des résultats, concernant l'analyse des lipides de la luzerne, puisque la mise en évidence d'une répartition spécifique des acides gras était l'objectif même de cette recherche.

Nous n'avons cependant pas étudié cette répartition spécifique dans les fractions : phosphatides, esters de stérol ou glycérides partiels. Or ces fractions sont présentes en quantités notables. Nous relevons cependant que la comparaison des proportions relatives au niveau des acides gras totaux de la luzerne et au niveau des acides gras et des fractions étudiées (dialysable et non-dialysable) laissait entrevoir que les fractions non étudiées (phosphatides en particulier) devaient contenir une proportion importante d'acide palmitique. Or un travail récent de WEENINK (110) (1962) confirme cette hypothèse ; cet auteur indique en effet une proportion voisine de 50 p. 100 pour l'acide palmitique dans les acides gras des phospholipides.

La répartition en fractions lipidiques comportant chacune une composition spécifique d'acides gras appuie la similitude qui peut apparaître entre les lipides végétaux et les lipides animaux. On connaît en effet les grandes différences au niveau des proportions relatives des acides gras des différentes fractions des lipides sanguins par exemple : esters de cholestérol, phospholipides, glycérides, acides libres.

Une composition spécifique d'acides gras suppose une fonction définie de la fraction lipidique correspondante. Quelle est la fonction propre du glucido-lipide de la luzerne ? Cette fraction nettement différenciée constitue-t-elle une étape intermédiaire dans l'anabolisme de la plante ?

Il serait, semble-t-il, important de rechercher si les répartitions spécifiques des acides gras sont maintenues quel que soit le stade de maturité de la plante. S'il en était ainsi, une diminution d'acide linoléique de l'herbe devrait correspondre à une diminution de la fraction glucido-lipidique elle-même.

Les lipides de la luzerne, source des acides gras du beurre

On est frappé par la variété des acides gras identifiés dans les lipides de la luzerne. De nombreux acides intermédiaires sont présents. Malgré les différences fondamentales concernant les proportions relatives des acides gras entre la luzerne et le beurre, une similitude de nature est cependant bien établie.

LA VITAMINE C DANS LA CERISE

P. JACQUIN

avec la collaboration technique de M^{me} Claudette PRIOULT

*Station de Recherches cidricoles,
Centre de Recherches agronomiques de l'Ouest, Rennes (Ille-et-Vilaine)*

SOMMAIRE

La teneur en vitamine C de la cerise est mal connue. Le présent travail a pour but de préciser la répartition de la vitamine C de la cerise en acide *l*-ascorbique et acide déhydroascorbique, et d'étudier les variations de la richesse vitaminique de ce fruit, en fonction des variétés des différents groupes : Bigarreaux, Cerises, Guignes et Griottes.

INTRODUCTION

De tous les fruits communs de nos régions tempérées, le moins étudié au sujet de sa teneur en vitamine C, semble bien être la cerise. On ne trouve guère, dans la littérature spécialisée de langue française, que quelques chiffres moyens, dont l'origine est d'ailleurs peut-être unique, puisque la teneur généralement indiquée est de 17 mg p. 100 (GIROUD A., 1942 ; GIROUD F., 1956 et CAUSERET 1960). Il faut toutefois signaler que KOCH (1954) donne des teneurs de 58 à 177 mg p. 100 de matière sèche pour 4 variétés et que SCHAETZLEIN (1940) indique 7 mg pour 100 g pour la cerise douce *Heidelberger Frühe*.

La cause de ce désintéressement apparent est peut-être l'absence de vergers de collection de ce fruit, en France tout au moins, puisqu'en Grande-Bretagne un tel verger existe, groupant environ 300 variétés originaires de tous les points du globe.

Une petite collection de cerisiers ayant été réalisée dans les vergers de l'École nationale supérieure d'Agronomie de Rennes depuis 15 ans, nous avons pensé faire

œuvre utile en étudiant les différentes variétés mises à notre portée, du point de vue de leur teneur en vitamine C à maturité. Il eût sans doute été intéressant de préciser à quelle période de son évolution la cerise atteint sa richesse maxima en vitamine C, et de suivre ce constituant parallèlement aux acides organiques et aux sucres pendant toute la vie du fruit. Mais cette étude exigerait du temps et du personnel dont nous ne disposons pas, nous nous sommes donc contentés d'effectuer le dosage de la vitamine C à maturité ; en le répétant pour quelques variétés à quelques jours d'intervalle pour chiffrer les fluctuations dues surtout aux difficultés d'échantillonnage. Nos études antérieures sur les fruits à pépins (Tavernier et Jacquin, 1946) et celles de Peynaud (1948) et de Peynaud et Maurie (1950) sur les prunes et les pêches, ont montré que la richesse vitaminique C d'une espèce était fonction principalement de la variété, ainsi dans les pommes elle peut varier de 1 à 10 fois, dans les pêches environ de 1 à 6 fois, et de 1 à 14 fois dans les prunes, selon les variétés et les années. Il était donc intéressant à ce point de vue aussi, de comparer les variations pouvant se présenter entre différentes variétés du même fruit cultivées sur un même terrain, soumises donc aux mêmes influences écologiques et météorologiques.

TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Mode opératoire

Les fruits sont cueillis sur toutes les parties de l'arbre et analysés le même jour, ou mis au frigo à $+ 4^{\circ}$ pour être analysés le lendemain matin, s'ils sont récoltés en fin de journée.

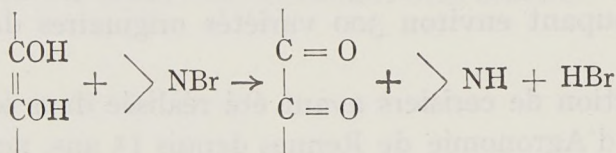
Pour l'analyse, on prélève au hasard un nombre de fruits tel que le poids total soit compris entre 15 et 20 g. Les fruits sont pesés au mg près, après avoir été équeutés. Puis ils sont broyés au mortier de verre en présence de 5 ml d'acide trichloracétique à 20 p. 100 et d'environ 10 g de sable fin pur lavé (de Fontainebleau) pour faciliter la dilacération complète des tissus. Cette opération terminée, on transvase la masse pâteuse obtenue en s'aidant du jet d'une pissette d'eau distillée dans le verre, dans une éprouvette de 100 ml. On complète le volume total à 100 ml, et on mélange soigneusement par agitation. On laisse reposer environ 2 heures, puis on prélève 10 ml du liquide clair sur lesquels on effectue le dosage de l'acide ascorbique. On effectue un deuxième prélèvement d'environ 12-13 ml qui servira au dosage de la vitamine C totale, après réduction de l'acide déhydroascorbique.

Enfin, on récupère les noyaux, les lave, les sèche et les pèse pour déterminer par différence, la partie comestible du fruit.

Méthode analytique

De nombreuses méthodes de dosage de l'acide ascorbique ont été proposées par les très nombreux chercheurs qui se sont penchés sur l'importance de l'évaluation précise de la valeur vitaminique C des divers aliments. Il ne nous appartient pas d'en faire ici la revue détaillée.

Dans un travail précédent, nous avons utilisé la méthode au 2-6 dichlorophénol-indophénol pour doser la vitamine C dans la pomme (Tavernier et Jacquin 1946). Ce réactif n'est pas rigoureusement spécifique de l'acide ascorbique et le dosage peut être perturbé par d'autres substances réductrices, dont les réductones. Nous avons donc accordé notre préférence à la N-bromosuccinimide, composé bromurant, dont Barakat et al. (1955) découvrirent qu'il possédait également une action oxydante pour l'acide ascorbique, la réaction pouvant s'écrire sous la forme :



D'après SCHALLER et RAFFAY (1957) qui étudièrent l'application de cette méthode aux jus de fruits, la spécificité de ce réactif pour l'acide *l*-ascorbique est très poussée, car dans les conditions du dosage, ni les hydrates de carbone, ni les alcools et aldéhydes, ni la réductone et l'acide réductinique, ni les acides aminés, ni les sels ferreux et ferriques ne perturbent la réaction. Mais il faut signaler que les sulfites, sulfures, pyrosulfites faussent le dosage.

L'indicateur de fin de dosage proposé par BARAKAT et al. (1955) repose sur le fait que le réactif ne libère l'iode de l'iodure de potassium en solution aqueuse d'acide acétique qu'après l'oxydation quantitative de l'acide *l*-ascorbique et avant l'attaque d'autres réducteurs pouvant être présents. L'iode libéré réagit alors avec un de ses détecteurs sensibles (amidon par exemple), nous avons choisi le thiodène.

Le virage est nettement perceptible pour les jus peu colorés ou de teinte jaune. Il est également facile à saisir pour les jus rose ou rouge pâle, et avec un peu d'entraînement on le perçoit également nettement avec les jus d'un rouge assez intense, comme nous en avons rencontrés avec les cerises. Cependant, si la coloration est trop intense (jus de cassis par exemple), il est possible de faire passer l'iode libéré dans un des solvants : éther sulfurique, chloroforme ou tétra-chlorure de carbone, d'après la méthode de EVERED (1960).

Nous avons vérifié la méthode de dosage à la N-bromosuccinimide sur des jus de fruits (pomme, ananas, tomate, abricot, orange, pamplemousse) en utilisant les divers solvants et directement au thiodène, les diverses variantes sont toutes valables, et nous avons choisi définitivement le thiodène pour la facilité de son emploi.

Réactifs nécessaires

- Solution d'acide trichloracétique à 20 p. 100.
- Solution d'iodure de potassium à 20 p. 100.
- Acide acétique glacial.
- Solution d'acide ascorbique à 20 mg pour 100 ml dans l'acide acétique à 1 p. 100. Cette solution est à préparer pour chaque série de dosages.
- Solution de N-bromosuccinimide à 20 mg dans 100 ml d'eau distillée dans le verre. A préparer pour chaque série de dosages.
- (1 cc de cette solution correspond environ à 0,2 mg d'acide *l*-ascorbique).
- Thiodène en poudre.
- Appareil Kipp à H_2S .
- Appareil Kipp à CO_2 .

Technique du dosage

— a) *Acide ascorbique*. 10 ml de la solution aqueuse des fruits dans l'acide trichloracétique obtenue comme il a été dit ci-dessus, sont introduits dans un tube à essai, on y ajoute 1 ml d'acide acétique glacial, 5 gouttes de la solution d'iodure de K, une pincée de thiodène, puis on fait arriver goutte à goutte la solution de N-bromosuccinimide contenue dans une burette au 1/20 de ml, jusqu'à teinte bleutée du liquide. On étalonne de la même façon cette solution de N-bromosuccinimide en titrant 5 ml de la solution d'acide *l*-ascorbique à 20 mg p. 100 soit n ml le volume de la solution de N-bromosuccinimide correspondant à 1 mg d'acide *l*-ascorbique.

— b) *Somme acide l-ascorbique + acide déhydroascorbique* (vitamine C). On prélève environ 12-13 ml de la dilution aqueuse des fruits, on la porte au bain-marie à 70° et y fait passer un courant de H_2S pendant 5 minutes pour assurer la réduction de l'acide déhydro en acide *l*-ascorbique selon la méthode de von FELLEBERG (1941). Puis on élimine soigneusement l'excès de H_2S par barbotage vigoureux de CO_2 , en vérifiant l'élimination au papier à l'acétate de Pb. Après ce traitement, on prélève 10 ml de la solution et y titre l'acide *l*-ascorbique comme précédemment.

Un calcul simple permet de rapporter à 100 g de fruits entiers et à 100 g de pulpe comestible les teneurs trouvées en acide *l*-ascorbique et en vitamine C totale.

RÉSULTATS

Cette méthode a été appliquée aux fruits de la récolte 1964, de la collection de cerisiers des vergers de l'École nationale supérieure d'Agronomie de Rennes.

TAB. I

	Date de cueillette	Nombre de fruits analysés	Poids des fruits en g	Poids des noyaux en g	Dans le fruit entier		Dans la partie comestible	
					Acide ascorbique en mg pour 100 g	Vitamine C totale en mg pour 100 g	Acide ascorbique en mg pour 100 g	Vitamine C totale en mg pour 100 g
<i>Bigarreaux</i>								
Hâtif Burlat	3 juin	3	17,546	1,230	13,0	19,0	14,0	20,4
Elton	3 juin	4	19,321	1,743	21,0	28,0	23,1	30,8
Madriague	3 juin	7	18,599	1,210	14,5	24,1	15,5	25,7
Moreau	4 juin	5	20,827	1,625	13,7	19,2	14,8	20,9
Princesse Cretel	4 juin	3	16,632	0,917	9,4	13,0	10,0	13,7
Princesse Cretel (bis)	4 juin	3	16,273	0,893	9,6	12,7	10,2	13,4
Jaboulay	4 juin	3	17,529	1,300	19,1	24,1	20,6	26,0
Cœur de pigeon (Richard) (mûrs)	4 juin	3	19,276	1,234	18,2	22,7	19,6	24,5
Cœur de pigeon (Richard) (mûrs)	16 juin	3	20,008	1,201	19,4	23,4	20,7	24,9
Noir d'Écully (mûrs)	9 juin	4	20,690	1,531	15,8	23,7	17,0	25,6
Noir d'Écully (mûrs)	11 juin	4	19,681	1,587	13,3	22,2	14,5	24,1
Espéren	9 juin	10	19,195	2,180	11,1	22,9	12,6	25,8
Bigarreau haut du jardin (mûrs)	9 juin	5	19,403	1,781	34,7	49,5	38,2	54,5
Bigarreau haut du jardin (mûrs)	11 juin	4	19,331	1,732	29,8	37,1	32,8	40,7
Noir tardif de Schneider	9 juin	4	19,577	1,126	12,5	20,3	13,3	21,6
Noir de Moravie (mûrs)	11 juin	4	17,101	1,136	7,6	15,8	8,2	16,9
Noir de Moravie (mûrs)	16 juin	3	16,294	1,008	6,7	13,5	7,2	14,3
Noir de Moravie (très mûrs)	22 juin	3	17,634	0,960	8,1	19,4	8,6	20,5
Blanc du pays d'Yonne	11 juin	5	19,590	1,448	8,9	22,3	9,6	24,1
Marmotte n° 1(mûrs)	16 juin	4	20,285	1,422	8,8	18,7	9,5	20,1
Marmotte n° 2(mûrs)	22 juin	3	17,411	1,012	18,1	23,8	19,2	25,3
Rouge de juin	16 juin	4	20,627	1,507	24,2	36,8	26,1	39,7
Gustave Dupau	16 juin	4	19,179	1,286	8,8	20,8	9,5	22,3
Stark Gold (fruits verts)	16 juin	10	16,757	3,369	7,7	12,5	9,7	15,6
Stark Gold (pas mûrs)	22 juin	5	16,966	1,762	12,2	21,2	13,6	23,5
Stark Gold (à peine mûrs)	24 juin	4	16,503	1,497	11,3	23,8	12,5	26,1
Stark Gold (mûrs)	30 juin	4	18,976	1,408	10,8	17,3	11,7	18,7
Stark Gold (bien mûrs)	6 juillet	4	20,091	1,399	9,3	24,4	10,1	26,3

TABLEAU 2

	Date de cueillette	Nombre de fruits analysés	Poids des fruits en g	Poids des noyaux en g	Dans le fruit entier		Dans la partie comestible		
					Acide ascorbique en mg pour 100 g	Vitamine C totale en mg pour 100 g	Acide ascorbique en mg pour 100 g	Vitamine C totale en mg pour 100 g	
<i>Cerises</i>									
Cerise de Querroy.....	4 juin	4	18,625	1,488	12,6	16,9	13,5	18,0	
Cerise Dubreuil n° 1.....	9 juin	6	17,054	1,918	13,7	19,9	15,5	22,4	
Cerise Dubreuil n° 2 (à peine mûres).....	22 juin	6	16,954	1,840	14,3	22,8	16,1	25,6	
Cerise X.....	16 juin	3	17,581	1,091	18,2	27,3	19,4	29,1	
Cerise C 35 (avant maturité).....	16 juin	6	18,589	1,947	13,4	18,8	15,0	21,0	
Cerise C 35 (mûres).....	22 juin	3	16,938	1,035	19,7	27,1	20,9	28,9	
Cerise Noire très tardive (mûres).....	24 juin	5	18,980	1,729	24,9	35,7	27,4	39,3	
<i>Griottes</i>									
Montmorency à longue queue.....	16 juin	5	17,497	1,483	10,8	18,8	11,8	20,6	
Montmorency à longue queue (bien mûres).....	22 juin	5	18,579	1,272	12,6	22,8	13,5	24,4	
Griotte du nord.....	6 juillet	4	18,139	2,003	8,8	18,7	9,9	21,0	
<i>Guignes</i>									
Belle du Berry.....	3 juin	4	18,219	1,144	17,3	21,9	18,3	23,1	
Noire tardive à gros fruits.....	3 juin	6	18,262	1,153	20,5	27,3	21,9	29,2	
Précoce de la Marche (Arlico).....	3 juin	5	17,689	1,154	18,7	25,9	20,0	27,6	
Précoce de la Marche (Arlico).....	4 juin	5	18,570	1,222	19,0	21,6	20,4	23,1	
Très précoce de Perpignan.....	3 juin	7	17,340	2,368	13,2	15,6	15,3	18,0	
Ramon Oliva.....	4 juin	3	18,727	1,264	21,5	26,8	23,1	28,7	
Noire de Tartarie.....	4 juin	5	20,234	1,420	9,2	15,0	9,9	16,2	
Guigne d'Annonay.....	4 juin	6	19,532	1,022	20,3	26,2	21,8	28,1	
Précoce Renaud.....	9 juin	3	16,679	1,379	24,5	32,5	26,7	35,4	
Ohio's Beauty.....	9 juin	4	18,626	1,505	12,6	26,3	13,7	28,6	
Bonne Noire de Bissériér (mûres).....	30 juin	8	19,700	2,057	12,4	33,8	13,8	37,8	
Bonne Noire de Bissériér (bien mûres).....	6 juillet	9	16,595	2,503	12,5	29,0	14,7	34,1	

Nous avons ainsi analysé 37 variétés de cerisiers, réparties en :

Bigarreaux	18
Guignes	10
Griottes	2
Cerises	7

Pour quelques variétés, les analyses ont été répétées à quelques jours d'intervalle. Une des plus tardives *Bigarreau Stark Gold* a été suivie pendant 3 semaines ce qui a donné lieu à 5 analyses.

Les 2 tableaux ci-avant rassemblent les résultats obtenus.

DISCUSSION DES RÉSULTATS

Par l'examen rapide de ces tableaux, on s'aperçoit du premier coup d'œil que la teneur des cerises en vitamine C varie notablement d'une variété à l'autre. Si l'on calcule la richesse moyenne de chaque groupe, on remarque qu'il n'y a pas d'écarts sensibles entre bigarreaux, cerises, guignes, les moyennes étant respectivement de 25,10—26,36 et 27,55 mg pour 100 g de pulpe comestible ; n'ayant analysé que deux variétés de griottes, c'est insuffisant pour calculer une moyenne qui est, là encore, supérieure à 20 mg. Les fluctuations variétales sont pour la cerise, comme pour les autres fruits, relativement importantes : de 13,44 à 54,55 pour les bigarreaux qui présentent les valeurs extrêmes. Ce groupe de variétés semble donc être le plus soumis aux variations.

Une classification globale des variétés par ordre de richesse en vitamine C totale dans la partie comestible du fruit donnerait la répartition suivante : d'une part pour l'ensemble des 37 variétés, d'autre part pour les 18 bigarreaux :

Vitamine C totale dans la partie comestible	Totalité des cerises	Bigarreaux
13 à 15 mg pour 100 g.	1	1
15 à 20 mg pour 100 g.	4	1
20 à 25 mg pour 100 g.	13	8
25 à 30 mg pour 100 g.	13	5
30 à 35 mg pour 100 g.	1	1
35 à 40 mg pour 100 g.	4	1
> 40 mg pour 100 g.	1	1

Il est impossible d'attribuer une influence à l'acidité totale du fruit. En effet, le groupe le plus acide est celui des griottes : *Montmorency* en étant le type bien connu, les deux griottes analysées ne présentent pas de richesse extrême, mais une teneur plutôt inférieure à la moyenne des trois autres groupes.

Le rapport entre la vitamine C totale et la forme réduite (acide ascorbique) est lui aussi très variable. En règle générale, plus la cerise est tardive, plus la partie

de l'acide déhydroascorbique est importante par rapport à la forme réduite. Pour les bigarreaux mûrs après le 9 juin, par exemple, la partie oxydée est souvent plus grande que la forme réduite, ainsi pour les variétés :

	Vitamine C totale en mg pour 100 g	Acide ascorbique en mg pour 100 g	Acide déhydro- ascorbique par différence en mg pour 100 g
Blanc du pays d'Yonne	24,11	9,64	14,47
Noir de Moravie.	20,55	8,65	11,90
Marmotte n° 1	20,15	9,54	10,61
Gustave Dupau	22,35	8,50	12,85
Stark Gold	26,38	10,15	16,23
<i>de même pour les griottes, fruits tardifs :</i>			
Montmorency	24,49	13,55	10,94
Griotte du Nord.	21,06	9,94	11,12
<i>et les dernières guignes :</i>			
Ohio's Beauty.	28,67	13,74	14,93
Bonne noire de Bissériér (30 juin) ..	37,83	13,85	23,98
Bonne noire de Bissériér (6 juillet)	34,16	14,73	19,43

Il serait peut-être hâtif de conclure définitivement sur cette répartition de la vitamine C totale. Celle-ci peut être le fait d'une modification du métabolisme du fruit provoquée par des influences météorologiques. KOCH (1954) a constaté par exemple, qu'avec de fortes précipitations, il se produisait une diminution de la teneur en vitamine C dans les groseilles, les cassis et la variété de guigne *Speckkirsche*.

On observe en général avec la maturité un accroissement de la richesse des fruits en vitamine C totale, cependant quelques variétés paraissent faire exception à cette règle, telle que *Bonne Noire de Bissériér* pour laquelle nous avons trouvé les teneurs de 37,83 et 34,16 à une semaine d'intervalle, cette variation pouvant s'expliquer également par les difficultés d'un échantillonnage rigoureux. Il est impossible, malgré toutes les précautions prises d'avoir une image précise et exacte de la teneur en vitamine C de tout un arbre portant des dizaines de kilos de fruits, alors que l'analyse ne porte que sur 4 ou 5 fruits, d'un poids total de 20 g au maximum.

Les analyses faites en double le même jour, sur un même arbre, ou à des dates très rapprochées donnent une idée de l'importance des écarts que l'on peut attribuer à l'échantillonnage, ils sont parfois très faibles, voire négligeables, comme pour *Princesse Cretel*, *Cœur de Pigeon*, *Noire d'Écully* où il est inférieur à 5 p. 100, parfois plus importants, telle *Précoce de la Marche* où il atteint 16 p. 100 et *Bigarreau Haut du Jardin* où il dépasse 25 p. 100.

CONCLUSIONS

Ces quelques analyses confirment bien que dans les cerises, comme dans les autres fruits à noyaux ou à pépins, la richesse en acide ascorbique est surtout un caractère variétal. Nous nous associons donc pleinement à PEYNAUD (1948) pour

dire que « ... la richesse d'une espèce est mal représentée par un chiffre déterminé sur une variété quelconque de fruits achetés au marché. La moyenne doit être calculée à partir d'un grand nombre de variétés, autant que possible cultivées dans les mêmes conditions et doit s'accompagner des teneurs extrêmes. »

Les quelques chiffres que nous présentons dans ce travail remplissent ces conditions, nous les jugeons donc suffisants pour affirmer que les cerises représentent en général, une source intéressante d'acide ascorbique, puisque d'après les variétés étudiées, nous avons trouvé des teneurs variant de 13,44 à 54,55 mg pour 100 g de produit comestible avec une moyenne générale dépassant 25 mg.

Du point de vue alimentaire, cet apport d'acide ascorbique est très appréciable, et peut d'autant moins être négligé que les cerises sont les premiers fruits de l'année offerts en abondance sur le marché, puisque la récolte annuelle française dépasse un million de quintaux.

Reçu pour publication en février 1965

REMERCIEMENTS

Nous remercions bien vivement M. ROULON, maître de conférences et M. BODIN, chef de culture horticole à l'École nationale supérieure d'Agronomie de Rennes qui nous ont permis d'effectuer ce travail, en mettant à notre entière disposition le verger de collection de cerisiers de cet établissement.

SUMMARY

VITAMIN C IN CHERRIES

The wealth of vitamin C in cherries is still not generally known. The authors analysed 37 varieties of cherry, cultivated in the same orchard, for vitamin C in the form of *l*-ascorbic acid and dehydroascorbic acid. The *l*-ascorbic acid was determined by the N-bromosuccinimide method of BARAKAT *et al.* The entire vitamin C content was also determined by N-bromosuccinimide, after reduction of the dehydroascorbic acid (FELLENBERG's method).

The analytical results show that the varieties of cherry have characteristic vitamin C contents, as do other drupes and pomes. The average is about 25 mg per 100 g of the edible part, with extremes of 13.44 and 54.55 mg. Cherries can therefore be considered to be a very interesting source of vitamin C.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BARAKAT M. Z., SHEHAB S. K. and EL SADR M. M. 1955. A new titrimetric method for the determination of ascorbic acid *Analyst*, **80**, 828.
- BARAKAT M. Z., EL WAHAB M. F. A. and EL SADR M. M., 1955. Action of N-bromosuccinimide on ascorbic acid. New titrimetric methode for estimation of vitamine C. *Anal. Chem.*, **27**, 536-540.
- CAUSERET J., 1960. Tableaux de composition des fruits et légumes. Annexe à : La valeur alimentaire et thérapeutique des fruits et légumes. *O. E. C. E.*
- EVERED D. F., 1960. Determination of ascorbic acid in highly coloured solution with N-bromosuccinimide *Analyst*, **85**, 515-517.

- VON FELLEBERG Th., 1941. Ascorbinsäurebestimmungen in schweizerischen Lebensmitteln. *Mitt. Lebensm. Unters. Hyg.*, **37**, 135-162.
- GIROUD F., 1956. L'acide ascorbique dans les légumes et les fruits. *Fruits et Légumes*, 28 septembre — 1^{er} octobre 1956 C. N. R. S. 337-359.
- GIROUD A., RATSIMAMANGA A. R., 1942. *Acide ascorbique, Vitamine C*. Act. Sci. et Ind. Hermann édit. p. 151.
- KOCH J., 1954. Über der Vitamine C-Gehalt verschiedener Früchte während des Reifevorganges. *Die industrielle Obst und Gemüse Verwertung* **12**.
- PEYNAUD E., 1948. L'acide ascorbique (Vitamine C) dans les pêches, dans les prunes. *Rev. Hortic.* **3**, 69-73 et **4**, 111-113.
- PEYNAUD E., MAURIE A., 1950. La vitamine C dans les fruits à noyaux de la récolte 1949. *Rev. Hortic.* **1**, 24-26 et **2**, 52-53.
- SCHALLER A. und RAFFAY G., 1957. Über die Brauchbarkeit der N-Bromosuccinimid-Method für die Vitamin C-Bestimmung bei Fruchtsäften. *Fruchtsaft-Industrie*, **6**, 201-209.
- SCHAEZLEIN C., 1940. Vitamin C-Gehalt in Steinobst und Trauben, d'après *Schw. Zeitsch. Obst-Weinbau*, **9**, 166-167.
- TAVERNIER J. JACQUIN P., 1946. La vitamine C dans la pomme et les produits dérivés de la pomme. *Bull. Assoc. Chim.* **3-4**, 111-128.
-

ÉTUDE CHIMIQUE D'UN TROUBLE AU FROID RÉVERSIBLE PRÉSENT DANS UN JUS DE POMME

B. MONTIES et A. BARRET

Station de Technologie végétale, Versailles (Seine-et-Oise)

INTRODUCTION

Le trouble qui fait l'objet de cette étude a été observé dans des jus de pomme, des cidres, des vinaigres de cidre fabriqués dans des usines différentes. C'est un trouble physico-chimique nouveau dont l'apparition est difficilement prévisible. Lorsque la température de ces produits est voisine de 0°, un trouble important apparaît, il disparaît lorsqu'elle remonte. Ce trouble réversible gêne la commercialisation des produits dérivés de la pomme pendant la saison froide.

Afin de déterminer l'origine de ce trouble qui semble ne pas avoir été décrit jusqu'ici, nous avons entrepris d'en étudier la composition. La faible quantité de produit dont nous disposions nous a obligé à utiliser des microméthodes.

MÉTHODES ET TECHNIQUES

Le mode de fabrication du jus dans lequel nous avons isolé le trouble est le suivant : les pommes sont lavées, broyées et immédiatement pressées ; le jus a été traité aux enzymes pectolytiques (0,85 g/l) puis collé deux fois à la gélatine (0,6 g/l) ; il a été clarifié ensuite par filtration sur Kieselguhr puis sur masse et enfin sur filtre G5. Le jus a été pasteurisé en bouteilles, 20 mn à 68°.

a) Préparation des échantillons

Le trouble a été séparé du jus par centrifugation à 0° pendant 2 h à 12 000 g, il a été lavé trois fois à l'eau distillée, la température étant maintenue voisine de 0°. Les protéines du jus ainsi clarifié ont été isolées par deux précipitations successives avec le sulfate d'ammonium à saturation : cette fraction que nous désignons par la suite sous le nom de protéines est formée en réalité d'un mélange de matières azotées et de tannoïdes.

b) *Méthode de fractionnement*

Les divers échantillons ont été hydrolysés dans des tubes scellés en milieu HCl 6N, à 105° pendant 24 h. en présence d'un volume d'air réduit au minimum. Au cours de l'hydrolyse, les tannins ont été précipités sous forme de phlobaphènes que l'on a récupérés par centrifugation, lavés et pesés. Les hydrolysats contenant des acides aminés et des sucres ont été débarrassés de l'acide chlorhydrique par séchage sous vide en présence de pastilles de soude. Nous avons vérifié que ces hydrolysats ne contiennent plus de tannins par absorptiométrie à 280 m μ .

c) *Méthode d'analyse*

Nous avons dosé le fer et l'azote dans le jus clarifié et dans le trouble : le fer a été dosé par photolorimétrie à l'*o*-phénantroline, selon la méthode DEIBNER (1952) ; l'azote a été dosé par la méthode Kjeldahl. Les sucres ont été dosés dans les hydrolysats selon la méthode MOKRASH (1958) et l'on a tenu compte de la quantité de sucre détruite lors de l'hydrolyse. Cette destruction a été évaluée au moyen d'une réaction modèle reproduisant les conditions de l'hydrolyse : elle est de 60 p. 100 dans les conditions d'hydrolyse adoptées.

d) *Identification des composés présents dans les hydrolysats*

On a séparé les acides aminés et les sucres par chromatographie ascendante sur couche mince de cellulose.

1° *Acides aminés*

Les acides aminés contenus dans les hydrolysats de trouble, de protéine, de gélatine, ont été comparés après chromatographie à deux dimensions sur plaque 20/20 cm.

1^{er} solvant : éthanol 10, *n*-butanol 10, eau 5, acide propionique 2

2^e solvant : méthanol 4, éthanol 1, pyridine 2.

La révélation a été faite par chauffage à 95° après pulvérisation de 20 cm³ d'une solution alcoolique de 1 p. 100 de ninhydrine et 6 p. 100 de 2-4-6 collidine.

2° *Sucres*

Les sucres ont été séparés par double chromatographie ascendante avec comme solvant : acétate d'éthyle 2, pyridine 1, eau 2. La révélation a été faite par chauffage à 95° après pulvérisation de phtalate d'anisidine 0,1 M dans l'alcool.

RÉSULTATS

a) *Composition globale du trouble et du précipité de protéines*

Les tannins représentent près de 70 p. 100 du trouble. Ce sont des phlobatannins ou tannins condensés au sens de Freudenberg, ils sont caractérisés par la faculté de donner des phlobaphènes (CREFF, 1954). Nous avons cherché à préciser leur nature d'après leur spectre UV ; nous avons constaté que le trouble après remise en solution et le jus présentent un maximum d'absorption à 280 m μ dans l'éthanol pur et qu'ils absorbent aussi à 288 et aux environs de 298 m μ dans l'éthanol alcalinisé (l'amplitude de ces maxima varie avec le temps) : ces tannins sont probablement des polymères de catéchines et de leucoanthocyanidines (GEISSMAN, 1955 ; GOLDSTEIN, 1963).

Les matières azotées exprimées en acides aminés représentent près de 20 p. 100 du trouble. Rien ne nous permet d'affirmer que l'azote présent soit de nature protéique.

La quantité totale du sucre représente moins de 5 p. 100 du trouble même si l'on tient compte de leur destruction pendant l'hydrolyse. Nous avons caractérisé dans le trouble du glucose, du galactose et du fructose, en proportions voisines. Dans l'hydrolysate de protéines, nous avons rencontré surtout du galactose associé à une faible quantité de glucose.

TABLEAU I

Composition du trouble et des protéines

	Teneur (mg/l)	Composition en %			
		Tannin	Matière azotée ⁽¹⁾	Sucre ⁽²⁾	Fer
Trouble	34,25	67,5	19,3	4,4	0,08
Protéines	76,5	41	40	0,2	

⁽¹⁾ En acides aminés = $N \times 6,25$.

⁽²⁾ En glucose.

L'absence d'acides uroniques, de pentoses et de méthylpentoses nous indique que les pectines et les gommés ne participent pas directement à la formation de ce trouble.

Le fer ne semble pas être caractéristique du trouble dont il ne représente que 0,08 p. 100, le jus lui-même ne contient que 7,6 mg/l quantité insuffisante pour provoquer une précipitation par casse ferrique.

Pour préciser l'importance relative de chaque composant du trouble, nous avons calculé le nombre de micromoles de chaque élément contenu dans 1 g de trouble.

TABLEAU 2

Composition de 1g de trouble exprimée en micromoles

Tannins en catéchine	Matières azotées en atomes de N	Sucres en glucose	Fer en atomes de fer
2 310	2 210	245	14

Nous constatons que les molécules de catéchine et les atomes d'azote sont présents en quantités presque égales : ceci pourrait indiquer une relation définie entre ces constituants ; les sucres et le fer n'interviennent pas dans les proportions simples avec ces composés, nous pouvons donc conclure que les tannins et les matières azotées sont les constituants caractéristiques du trouble.

b) *Bilan de l'azote dans le jus trouble*

Dans le jus ainsi traité, un taux de 26,2 mg d'azote total est normal. Nous remarquons que l'azote protéique ne représente que 15 p. 100 de ce total ; il en représente 25 p. 100 si l'on compte comme azote protéique l'azote du trouble. Ces quantités sont insuffisantes pour provoquer une casse protéique.

TABLEAU 3

Bilan de l'azote dans le jus trouble

Dans le trouble (N total)	Dans le jus clarifié		Dans le jus brut (N total)
	N total	N dans le précipité de protéines	
2,1 mg	21,0 mg	3,1 mg	26,2 mg

c) *Composition et origine de la matière azotée du trouble*

Les principaux acides aminés caractérisés dans l'hydrolysât du trouble sont l'acide aspartique, l'acide glutamique, l'alanine et la glycine. Nous avons identifié en moindre quantité la lysine, l'arginine, la leucine, l'isoleucine, la valine, la proline, la tyrosine et la sérine.

Nous avons cherché à déterminer si les acides aminés présents dans le trouble provenaient des protéines du jus ou de la gélatine utilisée lors du collage. Nous avons constaté que les hydrolysats des protéines et de la gélatine présentent des chromatogrammes différents ; par contre, la comparaison qualitative du chromatogramme de l'hydrolysât de trouble avec ceux des derniers n'a pas permis d'établir si les matières azotées du trouble provenaient plutôt des protéines du jus de pomme que de la gélatine.

DISCUSSION

Le trouble au froid que nous avons étudié se distingue de tous les troubles déjà décrits par sa réversibilité et par sa solubilité dans l'alcool à 80°. Un autre type de précipité a été décrit dans les jus de pomme par KIESER, POLLARD et TIMBERLAKE (1957). Ce précipité apparaît après une longue conservation sans que la température semble jouer un rôle important : ce n'est pas le cas pour celui que nous avons étudié. La présence du cuivre qui est donnée par ces auteurs comme favorisant la formation de ce trouble n'est cependant pas indispensable puisqu'il se produit aussi spontanément en donnant alors un dépôt très peu riche en cuivre (0,08 p. 100). Lorsque ces auteurs ont ajouté du cuivre à un jus de pomme, ils ont

constaté que l'importance du dépôt augmente ainsi que sa teneur en cuivre. Il est assez vraisemblable que l'addition de cuivre provoque l'apparition d'un trouble différent du trouble primitif puisque leur composition est différente : en présence de cuivre ajouté, le trouble obtenu devient plus riche en protéines. Les auteurs supposent que le cuivre catalyserait l'oxydation chimique des polyphénols, sans tenir compte du fait que le cuivre peut aussi catalyser leur oxydation enzymatique par la polyphénol oxydase. Cet enzyme n'est pas entièrement inactivé par chauffage de 20 minutes à 68° et l'on a décrit un apoenzyme activable par fixation de cuivre (BENDALL et GREGORY, 1962). Enfin la composition du trouble que nous décrivons diffère de celle des précipités obtenus par KIESER, POLLARD et TIMBERLAKE sur les points suivants : sa teneur en protéine est deux à trois fois plus faible, sa teneur en tannin est deux fois plus forte, il ne contient pas de résidus pectiques alors que le trouble décrit par les auteurs anglais contient 2 à 4 p. 100 de pectines.

Le trouble que nous avons caractérisé n'est pas dû à une réduction après mise en bouteilles car il aurait disparu par oxygénation du jus ; il n'est pas dû à une casse ferrique ; ce n'est pas non plus un surcollage car nous avons vérifié par une addition de tannin qu'il n'existe pas d'excès de gélatine dans ce jus. Il s'agit d'un type nouveau de trouble caractérisé par une forte proportion de tannins associés à des matières azotées.

On peut donc penser que l'origine de ce trouble réside dans la présence de pré-curseurs des tannins qui au cours de la conservation deviennent de moins en moins solubles en se polymérisant, par dismutation ou par oxydation. Dans ces conditions, un abaissement de température suffit pour que leur concentration devienne supérieure à leur seuil de solubilité. De plus le trouble peut se reformer lentement dans le jus clarifié par suite de l'oxydation et de la polymérisation des précurseurs de tannins restés en solution.

Or la pratique du cuvage recommandée par BRUGIRARD et TAVERNIER (1952) qui a pour but la fixation et l'insolubilisation d'une fraction importante des tannoïdes sur la pulpe, n'est pas utilisée lorsqu'on fabrique les jus de pomme selon les techniques actuelles. On peut donc penser que ces procédés de fabrication conduisent à des produits plus riches en précurseurs de tannins, donc favorisent l'apparition du trouble que nous avons décrit. Cette hypothèse est en accord avec les résultats de KIESER et *al.* (1957) qui ont constaté qu'une oxydation rapide des substances phénoliques du jus se produit lorsqu'il n'est pas immédiatement chauffé et soustrait à l'action de l'air.

Reçu pour publication en Mars 1965.

SUMMARY

CHEMICAL STUDIES ON REVERSIBLE CHILL-HAZE IN APPLE JUICE

A new sort of haze had been found in apple juice, ciders and vinegar of ciders. This haze appears quickly by cooling, and is reversible by heating and soluble in ethanol 80 p. 100. Condensed tannins form 67 p. 100, amino-acid 19 p. 100, sugar 4 p. 100 of this haze. The absence of cuvage (oxydation of pulp by the air) probably leads to the formation of this haze.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BENDALL D. S., GREGORY R. P. F., 1963. Purification of phenoloxidases. in « *Enzyme Chemistry of Phenolic compounds* », Pergamon Press, 1-24.
- BRUGIRARD A. TAVERNIER J., 1952. Les matières tannoïdes dans les cidres et les poirés. *Ann. Technol. agric.* **1**, 311-343.
- CREFF R., 1954. Sur les tannins, les polyphénols et les pigments colorés du cidre, leur rôle éventuel dans les phénomènes d'oxydation et de réduction en cidrerie. *Ann. Technol. agric.* **3**, 259-265.
- DEIBNER L., BOUZIGUES H., 1952. Dosage électrophotocolorimétrique de traces de fer total dans les vins à l'aide de l'orthophénantroline. *Ann. Technol. agric.* **3**, 283-309.
- DEIBNER L. et BOUZIGUES H., 1953. Les méthodes de dosage colorimétrique des traces de fer dans les vins. *Ann. Technol. agric.* **1**, 65-74.
- GEISSMAN T. A., 1955. Anthocyanins, chalcones, aurones, flavones and related water-soluble plant pigments. In PEACH K, TRACEY MW. *Modern methods of plant analysis*, Springer Verlag, Berlin, **3**, 450-498.
- GOLDSTEIN J. L., SWAIN T., 1963. Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry*, **2**, 371-383.
- KIESER E. M., POLLARD A., TIMBERLAKE C. F., 1957. Metallic compounds of fruits juice. I. Copper as factor affecting sedimentation in bottled apple juice. *J. Sci. Food Agric.* **8**, 151-158.
- MOKRASH L. C., 1954. Analysis of hexoses phosphates and sugar mixture with anthrone reagent. *J. Biol. Chem.*, **208**, 55-57.
-

NOTE SUR LE MÉTABOLISME DES RAISINS EN SITUATION D'ANAÉROBIOSE

C. FLANZY et P. ANDRÉ

*Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches agronomiques du Sud-Est, Montfavet (Vaucluse)*

SOMMAIRE

Dans le cadre d'essais portant sur la vinification dite par macération carbonique, ou de « baies de raisin non écrasées », on s'est appliqué à étudier l'influence de la température et de la durée de macération sur la production d'alcool au cours de l'anaérobiose cellulaire.

Ces facteurs peuvent avoir une très grande importance dans la pratique de ce mode de vinification.

MATÉRIEL — MÉTHODE

Cent kilos de *Grenache noir* ont été cueillis en sélectionnant soigneusement sur souches les grappes de même exposition, apparemment de maturité identique et exemptes de moisissures. Les baies issues de quelques grappes et séparées du pédicelle au ras du pédoncule, formaient un ensemble relativement homogène, seules les baies saines et d'un volume approximativement moyen étant retenues. Cet ensemble était distribué à raison d'une à deux baies par lot, en 52 échantillons, et le processus a continué jusqu'à concurrence de 445 ± 5 grains par échantillon.

Ces échantillons, placés dans des ballons Keller de 1,5 l préalablement remplis de CO_2 , ont été divisés en trois séries correspondant aux températures de macération choisies : B = 15°C, D = 25°C, F = 35°C. Chacune de ces séries a été faite en double, d'où les essais I et les essais II.

Pour chacune des séries Température, nous avons constitué trois groupes d'essais marqués par des durées différentes de macération : 5 jours, 17 jours, 31 jours. Les mesures de perte de poids effectuées sur tous les lots à 5 jours (sur les trois séries), à 8 jours et 12 jours (sur les deux dernières séries) ont été comparées.

Dans ce travail nous examinerons seulement comme paramètres : d'une part, la perte de poids, d'autre part, l'alcool produit au cours du déroulement du même phénomène.

La perte de poids peut représenter grossièrement le CO_2 dégagé par le ou les métabolismes impliqués dans le processus. Elle a été suivie chaque jour par pesées directes des bocaux.

L'alcool a été dosé par oxydation chromique.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats sont traduits sur les graphiques 1 (Pertes de poids), et 2 (Production d'alcool). L'action de la température, la durée et la résultante de ces deux facteurs vont être successivement examinées.

Perte de Poids en g

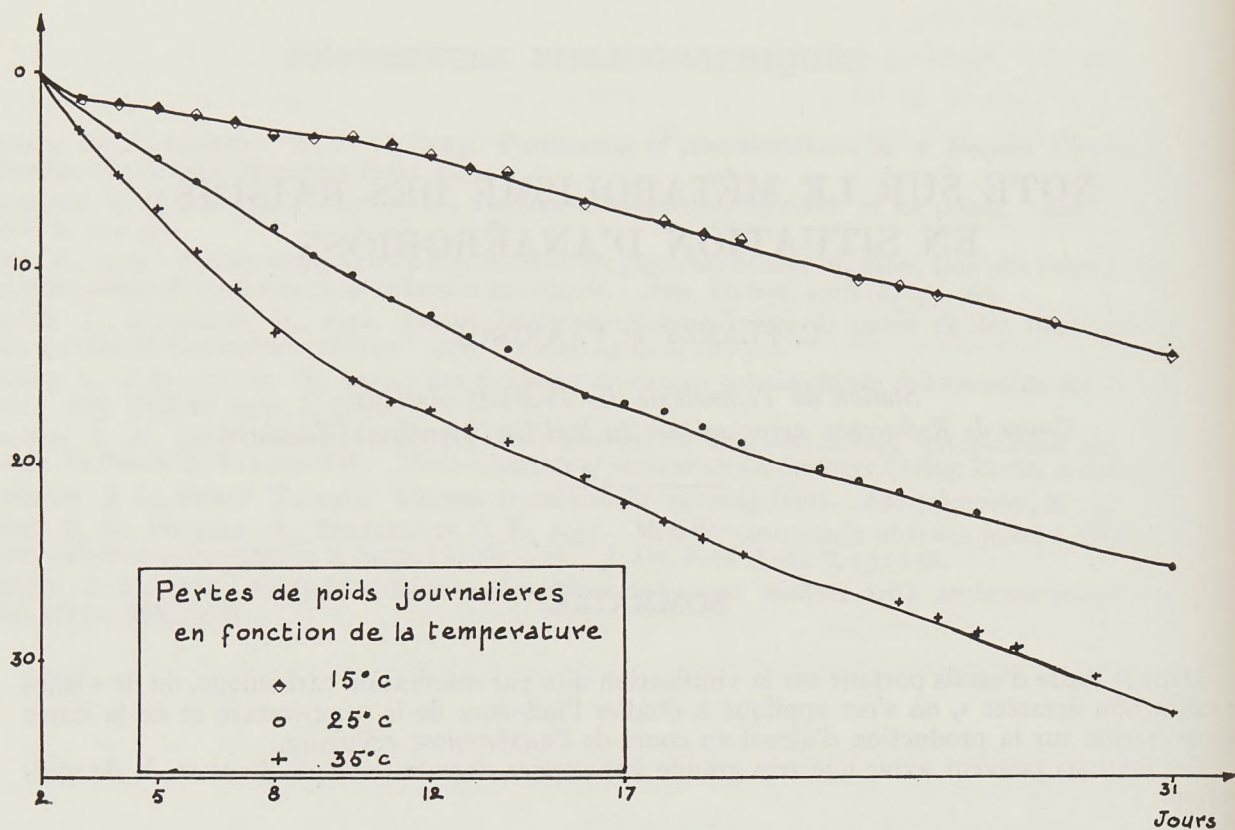


FIG. 1

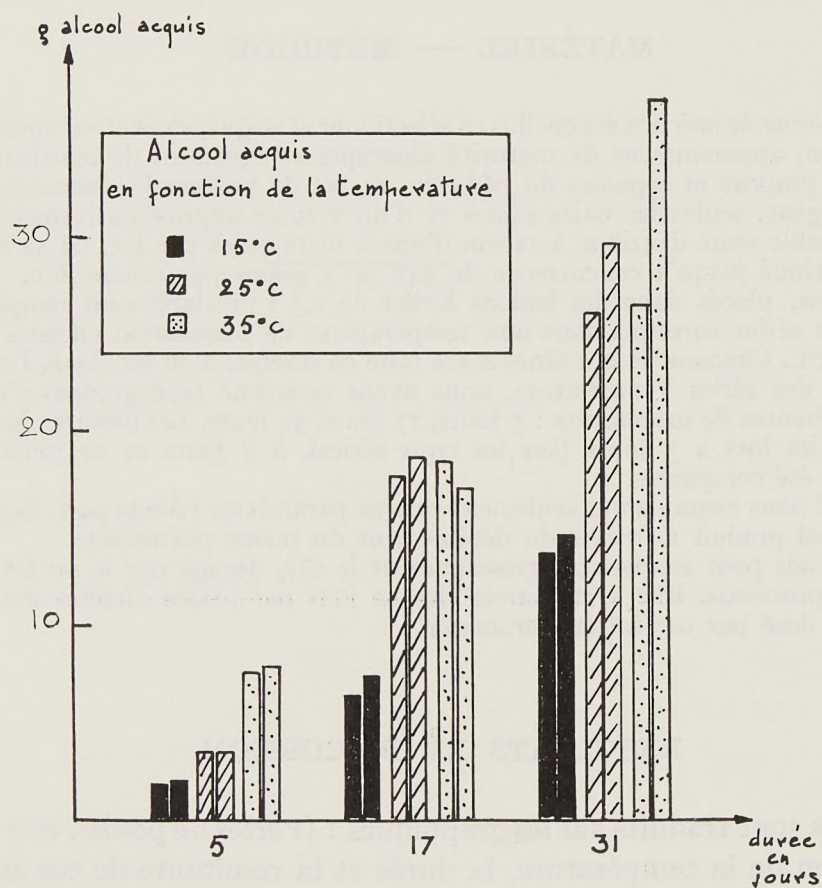


FIG. 2

A. Action de la température

Les courbes du graphique 1 représentent l'évolution des pertes de poids journalières d'un échantillon de chaque série. Les trois échantillons représentés, ont été choisis dans la catégorie des essais à 31 jours : pour une meilleure lecture des courbes.

On voit que pour une même durée, la perte de poids croît avec la température.

Le graphique 2 représente les quantités d'alcool produites pour des températures de 15°, 25°, 35°C.

Pour une même durée, la quantité d'alcool croît, dans les premiers jours, avec la température.

TABLEAU I

Pertes de poids (en milligrammes pour 100 grammes de matière fraîche)

Dans chaque case, la première ligne correspond aux résultats des essais I et la deuxième ligne aux résultats des essais II. La moyenne est calculée sur les deux groupes de mesures correspondantes

		Séries 5	Séries 17	Séries 31	Pertes moyennes	Différences des pertes moyennes	$Q\ 10\ \frac{T_1}{T_2}$
Après 5 jours	B (15°C)	218 272	218 313	184 249	242	$\Delta\ I = 157$	$Q\ 10\ \frac{25^\circ}{15^\circ} = 1,65$
	D (25°C)	318	413 415	400 447	399		
	F (35°C)	784 577	773 754	695 626	701	$\Delta\ II = 302$	$Q\ 10\ \frac{35^\circ}{25^\circ} = 1,75$
Après 8 jours	B		316 254	340 346	214	$\Delta\ I = 486$	$Q\ 10\ \frac{25^\circ}{15^\circ} = 2,50$
	D		766 870	761 805	800		
	F		1 296 1 231	1 332 1 181	1 260	$\Delta\ II = 460$	$Q\ 10\ \frac{35^\circ}{25^\circ} = 1,57$
Après 12 jours	B		494 490	437 480	475	$\Delta\ I = 806$	$Q\ 10\ \frac{25^\circ}{15^\circ} = 2,69$
	D		1 392 1 285	1 252 1 194	1 281		
	F		1 648 1 588	1 739 1 501	1 619	$\Delta\ II = 338$	$Q\ 10\ \frac{35^\circ}{25^\circ} = 1,26$

B. Action de la durée

Les courbes 1, ont une allure logarithmique, la vitesse de la perte de poids va en diminuant au cours du temps.

Il en est de même avec la production d'alcool dont la vitesse diminue avec la durée (graph. 2).

C. Action de la température et de la durée

Dans le tableau I, nous avons inscrit les pertes des poids, rapportées à 100 g de raisins initiaux, des divers échantillons au bout de 5, 8, 12 jours.

Les différences moyennes de pertes de poids entre les températures de 15°C et 25°C, soit ΔI , et les différences entre les températures de 25°C et 35°C, soit ΔII , rapportées à 100 g, figurent dans l'avant-dernière colonne.

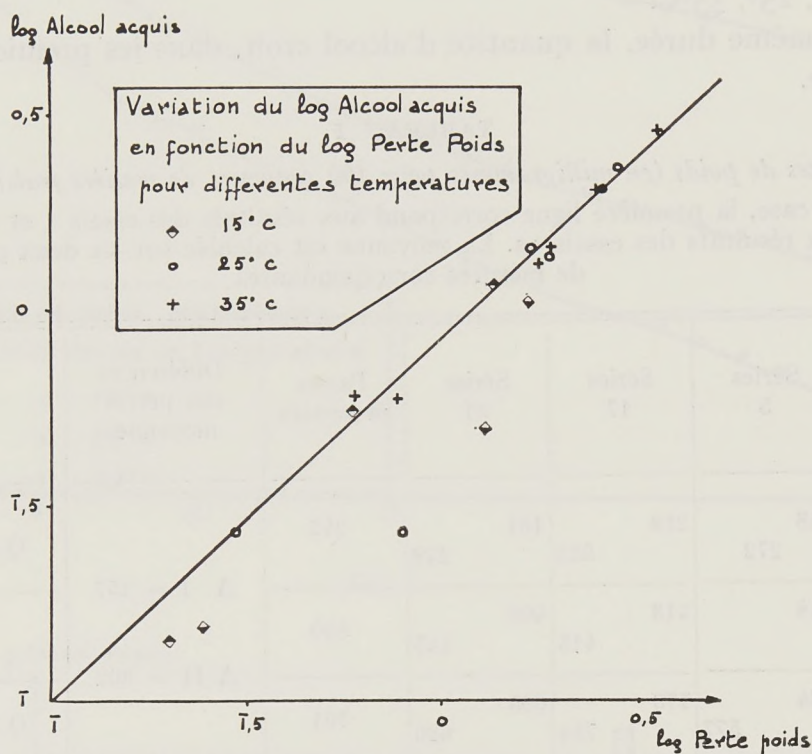


FIG. 3

La dernière colonne est réservée aux valeurs des Q_{10} . Le Q_{10} étant le quotient utilisé classiquement pour exprimer la loi d'action des températures dans des intervalles de 10°C.

$$Q_{10} = \frac{\text{Perte poids moyenne à température } (T + 10)^\circ\text{C}}{\text{Perte poids moyenne à température } T^\circ\text{C}}$$

ou approximativement

$$Q_{10} = \frac{\text{Poids } \text{CO}_2 \text{ dégagé à température } (T + 10)^\circ\text{C}}{\text{Poids } \text{CO}_2 \text{ à température } T^\circ\text{C}}$$

On observe que :

1° La valeur du $Q_{10}^{25^\circ}$ augmente avec la durée d'action de la température alors que la valeur du $Q_{10}^{35^\circ}$ décroît.

2° La valeur du $\Delta II_{25^\circ}^{35^\circ}$ est supérieure à celle du $\Delta I_{15^\circ}^{25^\circ}$ au bout de 5 jours ; elle lui est sensiblement égale au bout de 8 jours et lui est inférieure au bout de 12 jours.

De même, la valeur du $Q_{10}^{35^\circ}$ est légèrement supérieure à celle du $Q_{10}^{25^\circ}$ au bout de 5 jours ; le $Q_{10}^{35^\circ}$ est inférieur au $Q_{10}^{25^\circ}$ dès le 8^e jour et atteint une valeur inférieure à la moitié de celle du $Q_{10}^{25^\circ}$ au 12^e jour.

Ces observations confirment le ralentissement de la vitesse de perte de poids ou de dégagement de CO_2 . Ce ralentissement est dû, semble-t-il, à des phénomènes d'inhibition croissant avec la température et la durée. Peut-être intervient-il une valeur saturante de la somme alcool + métabolites (sucres...) ; ou bien l'inhibition est-elle due à l'action d'une quantité d'alcool agissant un certain temps à une température donnée, en atmosphère anaérobie, et conduisant à la mort des cellules végétales. Cette mort, ou du moins l'arrêt du métabolisme alcoolique des cellules, survenant d'autant plus rapidement que la température est plus élevée et la durée d'action plus longue.

Les résultats précédents peuvent donner la mesure du ou des phénomènes d'inhibition.

Le graphique 3 représente les logarithmes des quantités d'alcool produites par rapport aux logarithmes des pertes de poids calculées à partir d'expérimentations portant sur une durée de 5, 17 et 31 jours et pour trois températures choisies. Le nuage de points est distribué le long d'une droite. Il existe une corrélation entre la perte de poids p. 100 et l'alcool acquis ; cette corrélation restant proche de la même valeur quelle que soit la température et la durée de macération.

Ceci laisse supposer que nous sommes en présence d'un métabolisme ou de plusieurs métabolismes à peu près identiques quant à la production d'éthanol tout au long de la fermentation intracellulaire.

CONCLUSIONS

— Au cours de l'anaérobiose cellulaire, les métabolismes engendrant la perte de poids et la production d'alcool, sont moins rapides à 15°C qu'à 25°C et *a fortiori* 35°C ; mais, par contre, ils se manifestent plus longtemps à 15°C .

— Des phénomènes d'inhibition interviennent dans le temps, avec, à la limite, l'arrêt du processus de production d'alcool, et peut être, la mort des tissus cellulaires.

A ce moment-là, la diffusion des matières colorantes de la pellicule dans la pulpe pourrait s'accélérer : certains phénomènes cessent, d'autres apparaissent.

— Les métabolismes ou le métabolisme, entrant en jeu au cours de cette fermentation, aboutissent à un rendement alcoolique indépendant de la température et de la durée de nos essais.

Il semble donc que les deux facteurs : temps et température influent sur la cinétique du phénomène et non sur son « rendement alcoolique ».

Sur le plan technologique, le plein effet de cet état d'anaérobiose ou tout au moins un effet suffisant, sera obtenu d'autant plus rapidement que la température sera plus élevée, dans les limites étudiées de $+ 5^\circ$ à 35°C .

Or, c'est pendant cette période d'anaérobiose que les caractères spécifiques de cette technique de vinification apparaissent. C'est dire toute l'importance des constatations précédentes.

Reçu pour publication en février 1965.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BÉNARD P., JOURET C., 1963. Essais comparatifs de vinification en rouge. *Ann. Technol. agric.* **12**, 85-102.
- CHAUVET J., BRÉCHOT P., DUPUY P., CROSON M., JUMANN R., 1963. Évolution des acides malique et lactique dans la vinification par macération carbonique de la vendange. *Ann. Technol. agric.* **12**, 237-246.
- FLANZY M., 1935. Nouvelle méthode de vinification. *C. R. Acad. Agric.*, **21**, 935-938.
- GALLAY R., VUICHOD A., 1938. Premiers essais de vinification en rouge d'après la méthode FLANZY. *Rev. Vitic.*, **88**, 238-242.
- PEYNAUD E., GUIMBERTEAU G., 1962. Modification de la composition des raisins au cours de leur fermentation propre en anaérobiose. *Ann. Physiol. vég.* **4**, 161-167.

NOTE DE LABORATOIRE

ANALYSE DES ACIDES GRAS VOLATILS
PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE
DE LEURS ESTERS OCTYLIQUES

P. DUBOIS

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

Le travail exposé ci-après tient compte de deux faits :

1. Les acides gras volatils libres sont fortement polaires, et leur analyse par chromatographie en phase gazeuse directe se heurte à des phénomènes d'adsorption parasites.

2. Dans les milieux biologiques ces acides se trouvent en faibles quantités et leur extraction par entraînement à la vapeur d'eau mène à l'obtention d'un distillat de volume important.

On s'est donc attaché :

1° A obtenir une analyse correcte à partir d'acides purs du commerce après estérification à l'*n*-octanol, l'excès d'alcool octylique utilisé dans cette opération étant retenu dans la colonne du chromatographe en phase gazeuse par de l'acide borique deshydraté à 225°C.

2° A préciser les conditions d'estérification à partir d'une solution aqueuse diluée.

I. — INTRODUCTION

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides volatils libres est celle de produits polaires susceptibles de s'associer en dimères. Ces deux faits sont responsables des traînées des pics obtenus si on n'a pas soin d'opérer avec un support inerte et une phase liquide polaire et acide. On renvoie à ce sujet le lecteur aux articles généraux de A. PRÉVOT et de J. SERPINET selon J. TRANCHANT (1964) et de J.-P. WOLFF (1964), ainsi qu'aux travaux de A. PRÉVOT et *al.* (1961), L. D. METCALFE (1963) et L. S. ETTRE et *al.* (1964).

En fait les caractéristiques du chromatographe dont on dispose peuvent être déterminantes quant au choix de la méthode à adopter. C'est ainsi que l'acide formique ne peut être décelé avec un détecteur à ionisation de flamme, et que des

adsorptions parasites peuvent avoir lieu dans les parties qui précèdent la colonne, en plus de celles qui ont lieu dans la colonne elle-même sur le support de la phase liquide. Le nettoyage de la chambre d'injection proposé par E. D. SMITH et A. B. GOSNELL (1962) s'est avéré insuffisant.

Il est alors apparu indispensable d'effectuer l'analyse sur des esters, qui, étant moins polaires, devaient permettre l'obtention de pics beaucoup plus symétriques.

L'estérification par un alcool léger (ou par un dérivé diazo léger) est exclue du fait des difficultés de manipulation de produits très volatils.

Il en est de même de l'intérestérification des savons de potassium par le sulfate de potassium et d'éthyle proposée par J. W. RALLS (1960), puis par I. R. HUNTER (1962).

On a donc utilisé la technique de N. L. MURTY et *al.* (1963) qui consiste à estérifier les acides volatils par un alcool lourd, et à éliminer l'alcool en excès par adsorption sur alumine activée.

On a employé l'alcool *n*-octylique, mais le formate d'octyle est retenu sur alumine activée sensiblement comme l'est l'alcool lui-même.

En vue d'éliminer l'alcool en excès, on a ajouté 20 p. 100 d'acide adipique à la phase liquide lors de la préparation de la colonne de chromatographie en phase gazeuse. L'alcool est alors bien retenu par estérification, (l'eau ne s'ionise pas dans le détecteur à ionisation de flamme et ne peut perturber l'analyse). Mais très rapidement est élué un produit dont on a tout lieu de penser qu'il s'agit de monoadipate d'octyle.

L'emploi d'acide borique proposé par R. M. IKEDA (1964) a permis d'aboutir à la solution décrite ci-après.

II. — MATÉRIEL ET TECHNIQUES

Matériel

Le chromatographe en phase gazeuse est le modèle F6/2F de Perkin-Elmer (modèle qui est muni d'un détecteur à ionisation de flamme).

— Colonne : acier inoxydable, 90 ou 180 cm de longueur, 4 mm de diamètre intérieur.

— Support : chromosorb P 60-80 mesh (*Johns-Manville-Acid Washed*).

— Imprégnation : 5 p. 100 d'Apiezon L.

— Au support imprégné on mélange mécaniquement 3 p. 100 d'acide borique finement broyé et passant au tamis de 60 mesh (0,250 mm)

La colonne est conditionnée une nuit à 225°C.

— Débits gazeux en ml minute :

Azote 40 — hydrogène 20 — air 250.

— Le détecteur et la chambre d'introduction sont maintenus à 250°C, la colonne à des températures variant de 160 à 180°C selon les produits à analyser.

Estérification

1° *A partir des acides purs.*

Comme il a été indiqué, l'estérification est menée selon la technique de RUHOFF et REID (1933) telle qu'elle est rapportée par N. L. MURTY et *al.* (1963).

5 à 100 mg d'acides volatils sont estérifiés par 1 ml de *n*-décanol à 10 p. 100 en poids d'acide chlorhydrique ($d = 1,19$), en présence de 4 ml d'éther de pétrole. Le mélange est agité une heure à

température ordinaire, puis il est lavé à l'eau distillée, séché sur sulfate de sodium anhydre, enfin l'éther de pétrole est en grande partie évaporé dans un léger courant d'air.

On a employé le *n*-octanol dont les propriétés physico-chimiques sont proches de celles du *n*-décanol.

2° *A partir d'une solution aqueuse très diluée.*

L'évaporation de l'eau ne peut se faire qu'en présence d'un excès d'alcalis. Les savons de potassium et de sodium des acides butyrique et caproïque provoquent la formation de mousses, aussi a-t-on préféré employer la chaux, qui, par ailleurs, permet d'obtenir une solution plus homogène lors de l'estérification.

L'évaporation à sec des distillats obtenus par entraînement à la vapeur d'eau, est menée par fractions successives d'un litre au plus en présence de la quantité de chaux nécessaire à la neutralisation de 0,5 ml d'acide chlorhydrique pur de densité 1,19.

Au résidu sec on ajoute successivement :

- 4 ml d'éther de pétrole ;
- 1 ml d'*n*-octanol RP (*Fluka*) ;
- 0,6 ml d'acide chlorhydrique RP ($d = 1,19$) ;
- 1 g de Driérite en granulés.

La suite des opérations est identique à celle indiquée dans le cas des acides purs.

III. — RÉSULTATS ET CONCLUSION

Cette technique est intéressante pour la recherche de traces, et la figure 1 montre l'analyse faite sur un mélange synthétique obtenu par addition de faibles quantités des divers acides volatils dans l'acide acétique pur.

L'acide formique peut être détecté à une teneur nettement inférieure à 1 p. 1 000 dans l'acide acétique pur. Les acides élués après l'acide acétique ne peuvent guère l'être qu'à une teneur de l'ordre de 2 p. 1 000, parce que leurs esters octyliques passent dans la traînée de l'acétate d'octyle.

Une impureté de l'alcool octylique est élue au niveau de l'isobutyrate d'octyle, ce qui diminue la sensibilité de la méthode pour l'acide correspondant.

D'un point de vue quantitatif les résultats obtenus sur les chromatogrammes correspondent aux esters et les surfaces mesurées doivent être corrigées pour passer aux acides :

$$\text{Surface corrigée} = \text{Surface mesurée} \times \frac{46 + 14 (n - 1)}{158 + 14 (n - 1)}$$

n étant le nombre d'atomes de carbone de l'acide, 46 correspond au poids moléculaire de l'acide formique, 158 à celui de formate d'octyle, et 14 à celui du groupe CH_2 .

Les coefficients ainsi calculés se sont révélés valables pour les acides volatils à chaîne linéaire, sauf pour le premier terme de la série : l'acide formique. Le formate d'octyle a un comportement particulier, et une réponse anormalement élevée dans un détecteur à ionisation de flamme. Ce fait est d'ailleurs rapporté par R. G. ACKMAN *et al.* (1964) en ce qui concerne les formates de méthyle, d'éthyle et de propyle.

On a ainsi été amené à adopter pour le formate d'octyle un coefficient mesuré et égal à 0,265.

Ne disposant pas d'un échantillon suffisamment pur d'acide isobutyrique on a adopté pour l'isobutyrate d'octyle le coefficient calculé pour $n = 4$.

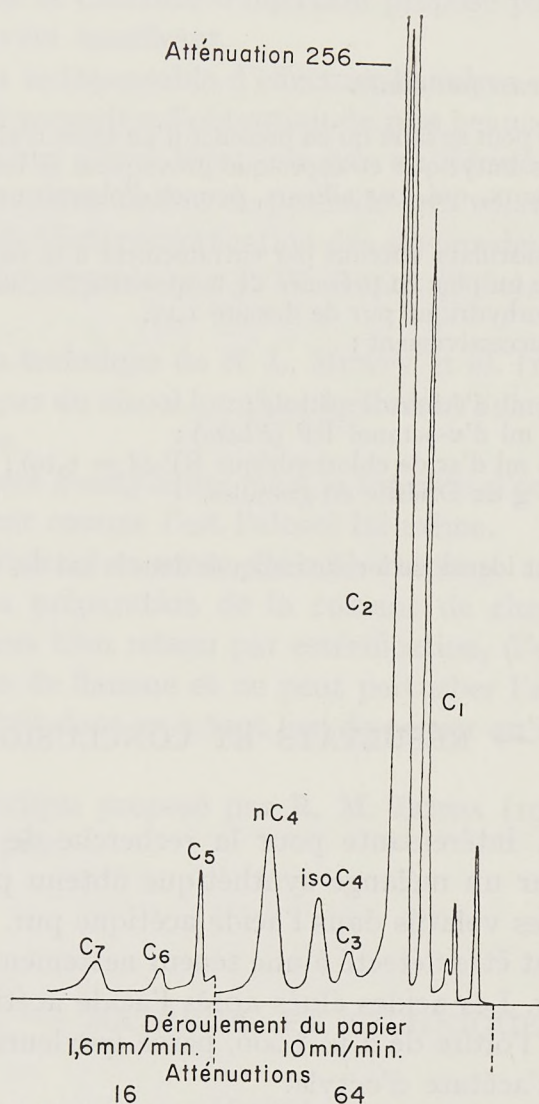


FIG. I. — Recherche de traces des divers acides dans l'acide acétique pur

Reçu pour publication en février 1965.

SUMMARY

ANALYSIS OF VOLATIL FATTY ACIDS BY GAS-LIQUID CHROMATOGRAPHY OF THEIR OCTYL ESTERS

Analysis of volatil fatty acids (C_1 - C_7) has been carried out on their octyl esters by gas-liquid chromatography.

n -octyl alcohol is removed on the column by 3 p. 100 of boric acid.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ACKMAN R. G., SIPOS J. C., 1964. Flame ionization detector response for the carbonyl carbon atom in the carbonyl group of fatty acids and esters. *J. Chromatogr.*, **16**, n° 2, 298-305.
 ETTRE L. S., KABOT F. J., AVERILL W., 1964. Gas chromatographic analysis of free fatty acids. *Riv. Ital. Sost. Gr.*, **41**, n° 3, 131-138.

- IKEDA R. M., SIMMONS D. E., GROSSMAN J. D., 1964. Removal of Alcohols from complex mixtures during gas chromatography. *Anal. Chem.*, **36**, n° 11, 2188-9.
- HUNTER IRVING R., 1962. Extension of flash exchange gas chromatography to ethyl esters of higher organic acids. *J. Chromatogr.*, **7**, 288-292.
- METCALFE L. D., 1963. The gas chromatography of fatty acids and related long chain compounds on phosphoric acid treated columns. *J. Gas Chromatogr.*, **1**, 7-11.
- MURTY N. L., CRAIG B. M., TULLOCH A. P., 1963. Quantitative analysis of short chain fatty acids using gas liquid chromatography. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.*, **40**, n° 2, 61-63.
- PRÉVOT A., CABEZA F., 1961. Dosage direct de l'eau et des acides gras courts par chromatographie en gazeuse. *Rev. Fr. Corps. Gras.*, **8**, n° 11, 632-636.
- RALLS J. W., 1960. Rapid method for semi-quantitative determination of volatil aldehydes, ketones and acids. *Anal. Chem.*, **32**, n° 3, 332-336.
- RUHOFF J. R., REID E. E., 1963. *J. Amer. Chem. Soc.*, **55**, 3825.
- SMITH E. D., GOSNELL A. F., 1962. Effect of preheater contamination on gas chromatographic analysis of strongly adsorbed substances. *Anal. Chem.*, **34**, n° 6, 646-648.
- TRANCHANT J., 1964. *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*. Masson et Cie., Paris.
- WOLFF J.-P., 1964. *Mises au point de Chimie analytique*, 12^e série, 181-228. Masson et Cie., Paris.
-

1. The first step in the analysis of a sample is to determine its composition. This is done by using a variety of methods, including gravimetric, volumetric, and instrumental techniques. The choice of method depends on the nature of the sample and the information required.

2. In gravimetric analysis, the sample is weighed and then subjected to a process that results in a change in mass, such as precipitation or combustion. The mass difference is then used to determine the concentration of the analyte.

3. Volumetric analysis involves the reaction of the sample with a known volume of a reagent of known concentration. The volume of reagent consumed is then used to determine the concentration of the analyte.

4. Instrumental methods, such as spectrophotometry and chromatography, involve the measurement of a physical property of the sample, such as absorbance or retention time, which is related to the concentration of the analyte.

5. The results of the analysis are then used to determine the concentration of the analyte in the sample. This is done by comparing the results to a standard curve or by using a known concentration of the analyte as a reference.



**ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE**

VOLUME 14

1965

NUMÉRO 3

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

149, rue de Grenelle - PARIS-7^e

ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE

VOLUME 14 1962 NUMÉRO 3

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des
auteurs et de l'Institut national de la Recherche agronomique,
à l'exception des sommaires et résumés.

INFLUENCE DE LA COMPOSITION DE LA RATION ALIMENTAIRE SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DU BEURRE DE VACHE ⁽¹⁾

Simonne KUZDZAL-SAVOIE

Station centrale de Recherches laitières et de Technologie des Produits animaux.

Centre national de Recherches zootechniques

Jouy-en-Josas (Seine et Oise)

DEUXIÈME PARTIE ⁽²⁾

⁽¹⁾ Ce travail a fait l'objet d'une Thèse de Doctorat ès Sciences naturelles, soutenue le 20 avril 1964, à la faculté des Sciences de l'Université de Paris.

⁽²⁾ La première partie de ce mémoire est parue dans le n° 2/1965 des Annales de Technologie agricole

CHAPITRE II

CONSTITUTION DES LIPIDES DE L'HERBE DE PÂTURAGE
RÉPERCUSSION DE CETTE CONSTITUTION
SUR CELLE DES LIPIDES DU LAIT

I. — Introduction

Pendant la période de pâturage, c'est-à-dire toute l'année en Nouvelle-Zélande presque toute l'année dans certaines régions maritimes à climat tempéré (Normandie), et seulement cinq ou six mois dans la plupart des pays d'Europe, l'indice d'iode du beurre varie. Il existe donc pendant la période de pâturage, des variations au niveau des proportions relatives des acides gras majeurs (saturés ou insaturés).

Puisque le changement de régime alimentaire constitue le facteur primordial de variation de la constitution en acides gras du beurre, il convient d'étudier les changements qui peuvent exister dans l'alimentation des vaches au pâturage. Le plus souvent en période de pâturage, l'herbe des prairies constitue le seul aliment des vaches laitières. Or l'herbe subit des modifications de toutes sortes au cours de cette période : modifications des constituants chimiques, de l'état physique, du coefficient de digestibilité, et sans doute aussi de la nature des microorganismes de la flore naturelle de l'herbe. Ces diverses modifications peuvent faire varier le déroulement des phénomènes métaboliques dont le rumen est le siège. Certains de ceux-ci, tels la production d'acides volatils, ou l'hydrogénation des acides insaturés, par exemple ont une incidence dans la détermination finale de la constitution en acides gras du beurre.

Cependant nous nous limiterons dans le présent chapitre à l'étude de la fraction lipidique de l'herbe consommée et à sa répercussion sur les acides gras du beurre. Des travaux antérieurs ont en effet montré l'existence probable d'une telle relation (BROUWER (12), 1944). Cependant cette relation n'a pas été réellement démontrée. Les auteurs néo-zélandais ont aussi progressivement été amenés à étudier la fraction lipidique de l'herbe de prairie en vue d'expliquer certaines variations de composition de la graisse du beurre qu'aucune autre considération ne pouvait expliquer (Mac DOWALL (20), 1962).

Récemment donc McDOWALL et GILLIVRAY (22) (1963) et HAWKE (42) (1963), ont présenté un ensemble de travaux sur ce point, comportant l'analyse comparée des acides gras de l'herbe, et des acides gras du lait mais il n'y a pas eu à proprement parler « preuve » de l'existence d'une relation de cause à effet puisque les quantités d'acides gras consommés et les quantités d'acides gras produits n'ont pas été déterminées.

La difficulté majeure pour établir la répercussion des acides gras de la ration alimentaire sur les acides gras du lait résulte précisément de la transformation d'une partie des acides gras alimentaires au niveau du rumen. Or il n'est pas actuellement possible de déduire la composition des acides gras à la sortie du rumen de la composition des acides gras de la ration.

Une seconde difficulté provient de ce que rien ne permet de distinguer un acide synthétisé au niveau de la glande mammaire de ce même acide introduit avec la ration.

L'utilisation des acides gras marqués devrait permettre de résoudre le problème du passage des acides gras alimentaires dans le lait. GLASCOCK *et al.* (36) (1956) ont utilisé cette technique et ont estimé que les acides gras alimentaires participaient dans une proportion voisine de 25 p. 100 à la formation des acides gras du lait. Mais il est nécessaire d'utiliser un acide marqué sur toute la chaîne et non seulement sur le carboxyle afin que tout doute soit écarté quant à une éventuelle dégradation de l'acide gras alimentaire suivie d'une nouvelle synthèse. L'utilisation des composés marqués présente cependant certaines difficultés lorsqu'il s'agit de gros animaux. Comme nous nous intéressons spécialement aux acides polyinsaturés nous avons cherché à exploiter certaines « conditions naturelles » devant lesquelles nous étions placés. En premier lieu nous savons que l'organisme animal ne synthétise pas les acides linoléique et linolénique. En second lieu nous connaissons le très faible pourcentage de ces mêmes acides dans la matière grasse du lait et au contraire le taux élevé de ces acides dans les lipides de l'herbe.

Dans le cas de l'alimentation à l'herbe, les acides linoléique et linolénique constituent l'essentiel des acides insaturés introduits dans la ration ; au niveau de la matière grasse du lait nous connaissons les modifications qui en découlent : augmentation du taux de l'acide oléique ou plus exactement du taux de l'acide monoène à 18 atomes de carbone, augmentation du taux de l'acide stéarique, de l'acide diène conjugué et de l'acide linolénique. L'objectif du présent chapitre est la mise en évidence des relations qui existent entre les différents acides gras de la ration et du lait.

Nous avons d'une part comparé le degré d'insaturation de la graisse ingérée à celui de la graisse du lait produit, et d'autre part nous avons comparé les acides insaturés de la ration aux acides saturés et insaturés du lait qui peuvent en provenir. L'ensemble de cette étude donna lieu à une même expérimentation que nous décrivons rapidement.

II. — Matériel et méthodes

L'expérimentation fut entreprise en 1960 au Centre national de Recherches zootechniques à Jouy-en-Josas. Elle commença en avril et se termina en octobre. La période de printemps fit l'objet d'un plus grand nombre d'investigations.

A. — CONSTITUTION DU TROUPEAU. ALIMENTATION

Le troupeau expérimental était constitué d'avril à fin juin par 3 vaches de race *Frisonne Pie Noire* et 2 vaches de race *Normande* ; ce groupe fut remplacé en juillet par un groupe de 8 vaches (4 de race *Frisonne* et 4 de race *Normande*). En septembre

4 vaches de race *Frisonne* furent substituées à 3 vaches de race *Normande* et 2 vaches de race *Frisonne*.

Pendant tout le temps de l'expérimentation, les vaches furent maintenues à l'étable. Elles furent, au début d'avril, progressivement amenées du régime alimentaire d'hiver, au régime à « l'herbe ». A partir du 12 avril, elles reçurent donc uniquement de l'herbe.

L'herbe qui leur était distribuée (en deux repas le soir et deux repas le matin) était fauchée quelques heures auparavant et provenait des prairies du Centre national de Recherches zootechniques.

La nature de l'herbe n'a pas fait de notre part l'objet d'une très grande attention, l'essentiel étant pour nous de connaître la quantité et la nature des lipides qu'elle contenait. En avril et mai, l'herbe était constituée par du Ray-grass ; le stade de floraison fut atteint au début de juin.

B. — PRÉLÈVEMENTS

a) de l'herbe

Généralement deux fois par semaine, le mardi et le jeudi on prélevait quelques kilos d'herbe sur le tas destiné à la nourriture des vaches. Cette herbe était immédiatement congelée à -20°C et entreposée à cette température. Les prélèvements d'herbe furent maintenus à ce rythme d'avril à fin juin. En juillet on préleva seulement deux fois de l'herbe et seulement une fois en septembre puis octobre.

b) du lait

Une étude antérieure (KUZDZAL-SAVOIE (60), 1957) ayant montré que la répercussion sur la composition de la matière grasse du lait d'une modification du régime alimentaire se faisait sentir dès la traite suivante et atteignait, pratiquement 48 heures après cette modification de régime, l'effet proche du maximum, — ce que confirmait d'ailleurs à la même époque McDOWALL et al. (21) (1957) — on décida de prélever le lait le soir et le lendemain matin du 2^e jour du prélèvement de l'herbe. Les prélèvements de lait eurent donc lieu le jeudi soir et le vendredi matin.

A la traite du soir et à la traite du matin, on prélevait une quantité de lait provenant de chacune des vaches en expérimentation. La quantité prélevée était proportionnelle à la quantité de lait produite. On constitua ainsi deux échantillons de lait de mélange pondéré, l'un correspondant à la traite du soir et l'autre à la traite du matin.

Deux échantillons de beurre furent préparés à partir de ces laits par la technique habituelle (cf. chapitre I).

C. — CONTRÔLES

Les quantités d'herbe consommée (en poids frais et en poids sec) étaient régulièrement déterminées chaque jour et pour chaque vache par les services de la Station de Recherches sur l'Élevage. On a relevé les quantités d'herbe consommées par les vaches en expérience la veille du jour du prélèvement de lait (jour intermé-

diaire aux jours de prélèvements d'herbe c'est-à-dire généralement le mercredi). Les vaches du troupeau étaient soumises au contrôle journalier du taux butyreux. Le taux butyreux retenu pour les calculs fut le taux butyreux moyen des deux jours sur lesquels se répartirent les prélèvements de lait. Lors des prélèvements de lait la quantité de lait produit était notée. Le tableau 20 résume le plan d'organisation des prélèvements et des contrôles.

TABLEAU 20

Organisation des prélèvements et des contrôles

J - 1	Mardi	Prélèvement d'herbe
J	Mercredi	Relevé de la quantité d'herbe consommée
J + 1	Jeudi	Prélèvement d'herbe Prélèvement de lait à la traite du soir Relevé de la quantité de lait produit à cette traite Relevé du taux butyreux de ce jour
J + 2	Vendredi	Prélèvement de lait à la traite du matin Relevé de la quantité de lait produit à cette traite Relevé du taux butyreux de ce jour

D. — DÉTERMINATIONS ANALYTIQUES

a) Analyse de l'herbe

Le broyage de l'herbe fraîche, suivi d'une extraction par un solvant organique, l'éther par exemple, ne permet pas l'extraction quantitative des lipides de l'herbe (BROUWER (12), 1944). Une extraction succédant à une attaque de l'herbe par une solution d'hydroxyde de potassium s'est par contre révélée plus efficace.

Nous avons donc soumis l'herbe fraîche à la saponification directe après l'avoir découpée en fins fragments (1 à 2 cm). L'analyse était ainsi conduite :

Dans un ballon de 1 000 ml on pesait 100 g d'herbe fraîche. On ajoutait successivement 50 ml d'eau distillée, 500 ml d'alcool, 100 g d'hydroxyde de potassium. Le ballon était maintenu 16 heures au bain-marie à 85°C.

Le contenu du ballon était ensuite filtré sur Buchner. L'herbe pressée, lavée à l'alcool éthylique à 50 p. 100 et pressée à nouveau. La fraction insaponifiable était extraite à l'éther de pétrole (6 à 10 extractions successives). L'éther de pétrole était évaporé et l'insaponifiable pesé. La solution de savons était acidifiée par l'acide chlorhydrique au 1/3 et les acides gras libres étaient extraits à l'éther de pétrole puis lavés, séchés sous vide et pesés.

On déterminait l'indice d'iode de ces acides totaux sur lesquels les acides polyinsaturés étaient dosés par la méthode spectrophotométrique de BRICE et SWAIN (40) (1945).

Nous désirions comparer les quantités d'acides gras consommées par les vaches laitières et les quantités d'acides gras produites dans le lait et il nous a paru logique de choisir pour l'analyse des acides polyinsaturés de l'herbe, la technique de dosage

que nous avons habituellement appliquée à la détermination des acides gras polyinsaturés du beurre et que nous considérons comme une méthode fidèle qui nous a permis d'obtenir au cours de nombreuses analyses d'échantillons de beurre des résultats toujours reproductibles et s'alignant sur les résultats indiqués par d'autres auteurs (RIEL (85), 1963).

D'autres méthodes de dosage des acides polyinsaturés différant par les techniques expérimentales mises en jeu ont été proposées. HOLMAN en a présenté une étude critique (48) (1954). L'une de ces méthodes a fait l'objet d'une normalisation aux États-Unis en 1958 et est décrite par PAQUOT et *al.* (77) (1962).

Si la saponification préliminaire à laquelle a été soumise l'herbe nous a permis d'extraire quantitativement les acides gras elle a eu l'inconvénient de provoquer une isomérisation partielle au niveau des doubles liaisons des acides polyinsaturés de l'herbe. Nous avons vérifié que cette isomérisation ne modifiait pas le taux global d'acide diène, ni le taux global d'acide triène des acides gras de l'herbe dosés par spectrophotométrie.

Par ailleurs il nous a été possible de comparer sur trois échantillons d'acides gras d'herbe les résultats obtenus par l'analyse spectrophotométrique aux résultats obtenus par l'analyse chromatographique en phase gazeuse. Le taux des acides diènes obtenus par l'une et l'autre méthodes ont été trouvés équivalents, mais le taux d'acide triène obtenu par spectrophotométrie est resté légèrement inférieur au taux obtenu par chromatographie. Cette différence est apparue uniformément sur tous les échantillons, comme a permis de le montrer la comparaison entre les indices d'iode des acides gras de l'herbe « trouvés » et « calculés ».

Cette différence ne modifie cependant pas la signification des résultats obtenus, ceux-ci ayant avant tout un caractère relatif.

Nous avons également recherché la présence éventuelle d'un acide diène conjugué « naturel » dans les acides gras de l'herbe. Un taux de 0,9 p. 100 des acides totaux avait été indiqué par HARTMAN et *al.* (41) en 1956, sur un Ray-grass. En vue de cette recherche, l'herbe fraîche coupée a été congelée à -25°C puis lyophilisée, enfin broyée rapidement (broyeur WILEY, tamis n° 20) et soumise à une extraction à l'éther de pétrole dans un extracteur BBS (appareil semblable à l'appareil de Soxhlet dans lequel le siphon est remplacé par une pièce cylindrique en verre munie à sa partie inférieure d'une plaque en verre fritté, et qui contient l'échantillon sur lequel s'effectue une extraction continue). L'absorption à 232 μ a été étudiée sur cet extrait lipidique.

b) Analyse du beurre

Les échantillons de beurre provenant de la traite du matin et de la traite du soir furent analysés séparément. Sur la matière grasse du beurre, on détermina l'indice d'iodé et la composition des acides polyinsaturés par spectrophotométrie (BRICE et SWAIN (10), 1945).

III. — Résultats

Nous rapporterons successivement les résultats relatifs aux quantités d'acides gras consommés et de matière grasse produite et les résultats relatifs à la nature et aux proportions relatives des acides gras de l'herbe et des acides gras du beurre.

Signalons dès maintenant que l'examen du spectre ultra-violet du simple extrait lipidique de l'herbe lyophilisée a montré qu'une forte absorption de fond existe dans la zone des longueurs d'onde voisine de 232 m μ mais aucun maximum d'absorption n'apparaît. Il est ainsi possible d'affirmer que l'acide diène conjugué n'est pas un constituant initial des lipides de l'herbe.

A. — BILAN CONSOMMATION D'ACIDES GRAS, PRODUCTION DE MATIÈRE GRASSE

On a calculé la quantité d'acides gras consommés dans la journée (J) située entre les jours de prélèvements des échantillons d'herbe respectivement (J — 1) et (J + 1), et on a calculé la quantité de matière grasse produite lors de la traite du soir du jour J + 1 et lors de la traite du matin du jour J + 2. Ces quantités sont portées dans le tableau 21 et sur les figures 20 et 21. Ces deux dernières figures se rapportent seulement à la période avril-fin juin. Sur le tableau 22 sont portés les résultats de l'analyse des échantillons d'herbe.

TABLEAU 21

*Relation entre l'insaturation de la fraction lipidique de la ration
et l'insaturation de la matière grasse du lait*

Dates des relevés de consommation d'herbe	Date des prélèvements de lait	Nombre de vaches du troupeau	Consommation d'acides gras (en g)		Indice d'iode des acides gras	Insaturation à la consommation Ind. iode ac. gr. $\times$ pds des ac. gr. 100
			totale	par vache		
14-4-60	15, 16-4	5	2796	559	163	4557
20-4-60	21, 22-4	5	3527	705	169	5960
27-4-60	28, 29-4	5	3459	692	147	5085
4-5-60	5, 6-5	5	2416	483	179	4324
11-5-60	12, 13-5	5	1863	373	143	2664
18-5-60	19, 20-5	5	1409	282	175	2466
26-5-60	27, 28-5	5	—	—	—	—
1-6-60	2, 3-6	5	640	128	156	998
8-6-60	9, 10-6	5	971	194	160	1554
15-6-60	16, 17-6	5	1605	321	172	2760
22-6-60	23, 24-6	5	1212	242	142	1721
29-6-60	30-6, 1-7	3	858	172	151	1295
6-7-60	7, 8-7	8	2305	288	178	4103
20-7-60	21, 22-7	8	3403	425	172	5853
3-9-60	5, 6-9	7	2654	379	169	4485
5-10-60	5, 6-10	7	3643	520	156	5683

a) Consommation d'acides gras (figure 20)

D'une vache à l'autre, la quantité de nourriture absorbée varie relativement peu, ainsi d'ailleurs que la quantité d'acides gras, étant donné qu'il s'agit pour tout le troupeau et pour un jour donné du même aliment. Mais la quantité d'acides gras

TABLEAU 2I (suite)

Dates des relevés de consommation d'herbe	Dates des prélèvements de lait	Nombre de vaches du troupeau	Production de matière grasse (en g)		Indice d'iode beurre (*)	Insaturation à la production Ind. iode du beurre × pds de mat. gras 100
			totale	par vache		
14-4-60	15, 16-4	5	2720	544	33,2	903
20-4-60	21, 22-4	5	2841	568	34,7	896
27-4-60	28, 29-4	5	2885	577	33,5	967
4-5-50	5, 6-5	5	2712	542	31,8	862
11-5-60	12, 13-5	5	2294	459	32,3	741
18-5-60	19, 20-5	5	2257	451	32,7	738
26-5-60	27, 28-5	5	2075	415	35,2	730
1-6-60	2, 3-6	5	1856	371	34,7	644
8-6-60	9, 10-6	5	1974	395	35,8	707
15-6-60	16, 17-6	5	1863	373	37,4	697
22-6-60	23, 34-6	5	1800	360	34,8	626
29-6-60	30-6, 1-7	3	1082	360	41,6	450
6-7-60	7, 8-7	8	3297	412	45,0	1484
20-6-60	21, 22-7	8	2725	340	45,0	1226
3-9-60	5, 6-9	7	2566	366	42,9	1101
5-10-60	5, 6-10	7	2151	307	43,3	931

TABLEAU 2I (suite)

Dates des relevés de consommation d'herbe	Dates des prélèvements de lait	Nombre de vaches du troupeau	Rapport G	Rapport I Insaturation à la production Insaturation à la consommation
			$\frac{\text{Production mat. gras}}{\text{Consommat. ac. gras}}$	
14-4-60	15, 16-4	5	0,97	0,20
20-4-60	21, 22-4	5	0,80	0,17
27-4-60	28, 29-4	5	0,83	0,19
4-5-60	5, 6-5	5	1,12	0,20
11-5-60	12, 13-5	5	1,23	0,27
18-5-60	19, 20-5	5	1,60	0,30
26-5-60	27, 28-5	5	—	—
1-6-60	2, 3-6	5	2,94	0,64
8-6-60	9, 10-6	5	2,03	0,45
15-6-60	16, 17-6	5	1,17	0,25
22-6-60	23, 24-6	5	1,49	0,36
29-6-60	30-6, 1-7	3	1,26	0,35
6-7-60	7, 8-7	8	1,43	0,36
20-7-60	21, 22-7	8	0,80	0,21
3-9-60	5, 6-9	7	0,96	0,25
5-10-60	5, 6-10	7	0,59	0,16

* Le chiffre est la moyenne entre l'indice d'iode du beurre correspondant à la traite du soir et l'indice d'iode du beurre correspondant à la traite du matin.

consommés varie beaucoup en fonction du temps car le taux d'acides gras par rapport à l'extrait sec de l'herbe varie lui-même en fonction du temps ; la consommation en kilos d'extrait sec d'herbe reste par contre relativement constante. La consommation d'acides gras passe ainsi de plus de 600 g par jour fin avril à moins de 200 g au début juin.

En ce qui concerne le taux d'acides gras de l'herbe (tableau 22) on observe une diminution régulière de ce taux de la mi-avril (5,7 p. 100) à la mi-juin (1,5 p. 100), période de floraison de l'herbe, suivie d'une augmentation vers la fin de l'été ; on retrouve en octobre un taux d'acides gras voisin du taux observé au début du printemps.

TABLEAU 22

Analyse de l'herbe

Date de prélèvement	N° de l'échantillon	Extrait sec (à l'analyse)	Acides gras (% ext. sec)	Indice d'iode des acides gras	Insapo- (% ext. sec)	Indice d'iode aliment (par kg ES d'herbe)
8-4	1	23,0	4,0	143		57
12-4	2	19,0	4,7	168		79
14-4	3	16,9	5,8	163		95
19-4	4	17,7	5,9	169		100
26, 28-4	5	20,4	5,7	147		84
3, 5-5	6	20,4	3,7	179	1,5	66
10, 12-5	7	18,8	3,1	143	1,0	43
17, 19-5	8	22,9	2,1	175	0,6	37
24, 26-5	9	21,1		166	0,6	—
31-5, 3-6	10	32,4	1,5	156	0,6	23
5, 11-6	11	24,8	1,9	160	0,9	30
14-6	12	22,1	2,5	172	0,8	43
21, 23-6	13	32,8	2,4	142	0,5	34
28, 30-6	14	22,8	3,1	151	1,0	47
5, 7-7	15	14,8	4,4	178	1,2	78
20, 27-7	16	15,3	4,2	172	1,6	72
5-9	17	20,0	3,6	169	1,2	60
6-10	18	23,4	4,7	156	1,3	73

b) Production de graisse

D'une vache à une autre du troupeau expérimental on observe une plus grande dispersion en ce qui concerne la quantité de graisse produite qu'en ce qui concerne la quantité d'acides gras consommés. Ceci tient à la variabilité génétique bien établie du caractère « production de graisse » (AURIOL et JARRIGE (6), 1962). Cependant, pendant la période d'avril à fin juin, la quantité de graisse produite dans le lait par les 5 vaches du troupeau varie dans tous les cas de façon parallèle (figure 21).

On peut donc, sans risque d'erreur, poursuivre la présentation des résultats en considérant le troupeau dans son ensemble.

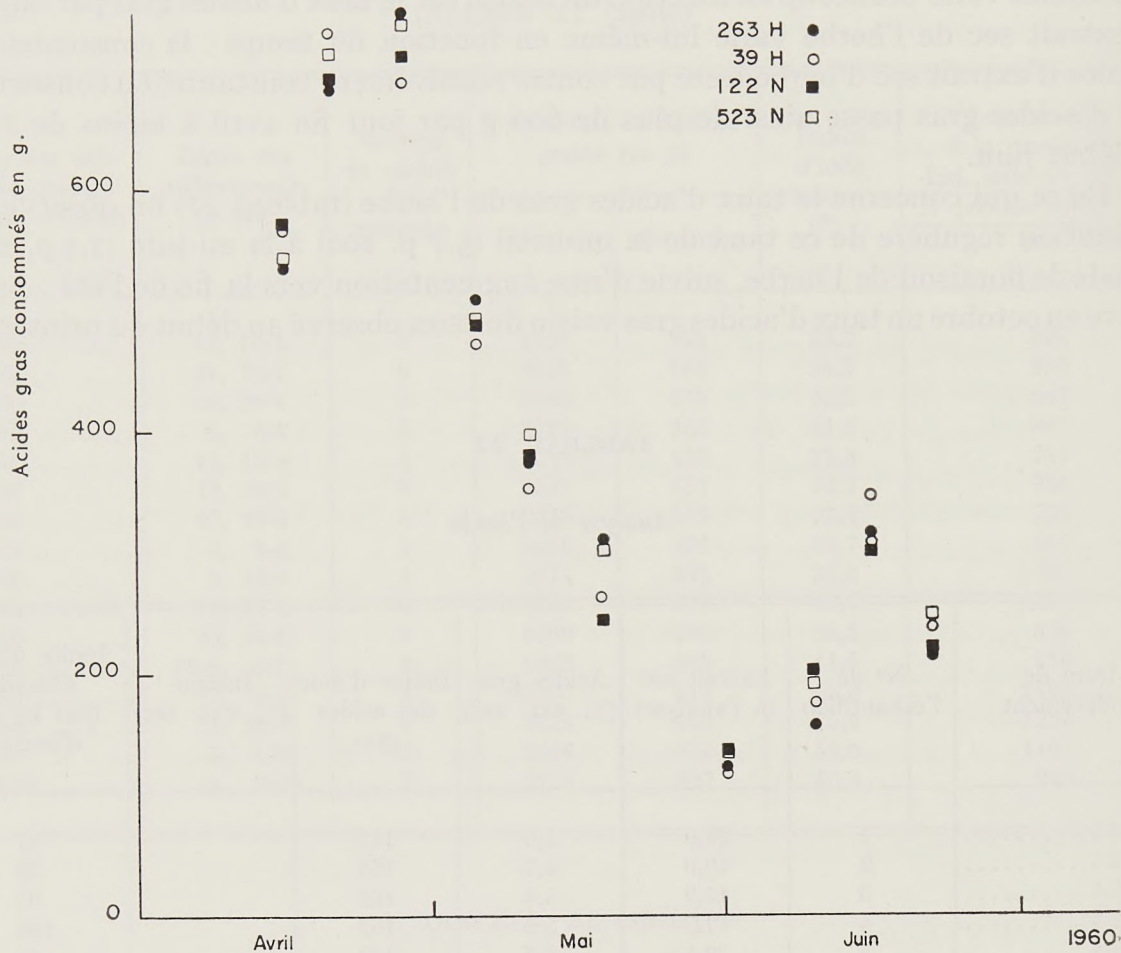


FIG. 20. — Quantités d'acides gras (en g) consommés par les vaches laitières (263 H, 39 H, 122 N et 523 N) les jours indiqués

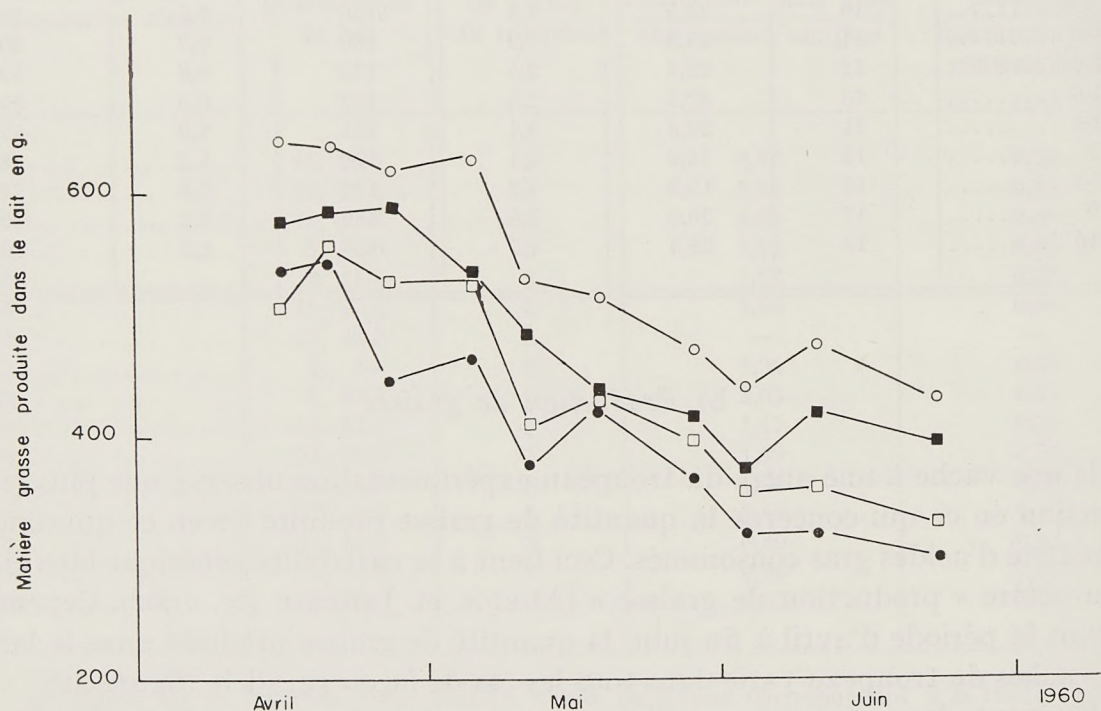


FIG. 21. — Quantités de matière grasse (en g) produite dans le lait par les quatre vaches laitières (263 H ●—●, 39 H ○—○, 122 N ■—■ et 523 N □—□) les jours indiqués

c) *Comparaison consommation d'acides gras
et production de graisse*

Ces deux valeurs ne présentent pas de liaison définie. On note cependant que la quantité de graisse produite est particulièrement élevée entre la mi-avril et la mi-mai, pour les quatre vaches soumises à l'expérimentation.

d) *Comparaison au niveau de l'insaturation*

L'indice d'iode des acides gras de l'herbe varie quelque peu, les valeurs extrêmes sont 142 et 179. Les valeurs les plus basses sont observées vers la fin de juin.

L'indice d'iode du beurre reste relativement constant pendant le printemps mais s'élève nettement vers la fin de l'été et le début de l'automne.

Cependant, calculé par rapport au poids sec d'herbe, l'indice d'iode (indice d'iode-aliment) accuse une nette variation saisonnière, avec les valeurs les plus faibles observées en juin. L'insaturation globale des acides gras consommés les jours J suit une évolution voisine et on retrouve une évolution de même sens de l'insaturation globale de la graisse du lait produit les jours J + 1 et J + 2. Les quantités d'acides

TABLEAU 23

Analyse des acides gras de l'herbe (1960)

N° des échantillons	Date de prélèvement	Indice d'iode des acides gras totaux	Acides polyinsaturés en g p. 100 d'acides totaux	
			Diènes (C _{18:2})	Triènes (C _{18:3})
1	8-4	143	—	—
2	12-4	168	9,2	32,8
3	14-4	163	10,6	31,5
4	19-4	169	15,9	32,9
5	24-4, 28-4	147	13,6	29,2
6	3-5, 5-5	179	18,0	32,0
7	10-5, 12-5	143	14,9	38,4
8	17-5, 19-5	175	26,9	29,4
9	24-5, 26-5	166	31,2	27,4
10	31-5, 3-6	156	13,8	34,0
11	5-6, 11-6	160	13,2	24,2
12	14-6	172	30,1	32,8
13	21-6, 23-6	142	12,5	23,0
14	28-6, 30-6	151	21,0	27,5
15	5-7, 7-7	178	17,0	37,1
16	20-7, 27-7	172	19,3	30,0
17	5-9	169	17,2	31,0
18	6-10	156	14,9	29,0

gras consommés et les quantités d'acides gras produits dans le lait sont connues ainsi que l'insaturation globale au niveau de ces deux valeurs. Un rapport Production de graisse / Consommation d'acides gras (rapport G) peut être calculé de même qu'un

rapport Insaturation-Production/Insaturation-Consommation (rapport I). Ces deux rapports, G et I, portés dans le tableau 21 varient au cours de la saison. On note que le rapport G souvent voisin de l'unité s'élève à près de trois lorsque la quantité de lipides de la ration s'abaisse nettement. Par contre dans l'expérience rapportée le rapport I reste toujours inférieur à 1, et, est le plus souvent, voisin de 0,2 — 0,3. L'insaturation totale de la graisse du lait produit reste donc inférieure à celle de la ration.

Si l'on porte sur la figure 22. les indices d'iode des acides gras de l'herbe et du beurre, les quantités de matière grasse consommées et produites et l'insaturation totale de cette matière grasse, on observe les points suivants :

— il n'existe pas de relation entre l'indice d'iode des acides gras de l'herbe et l'indice d'iode du beurre ;

— il n'existe pas non plus de relation entre la quantité d'acides gras consommés et la quantité de graisse produite :

— il semble apparaître, par contre, une relation entre l'insaturation des lipides de la ration et l'insaturation des lipides du lait secrété, tout au moins dans les conditions de l'expérience décrite (cf figure 22).

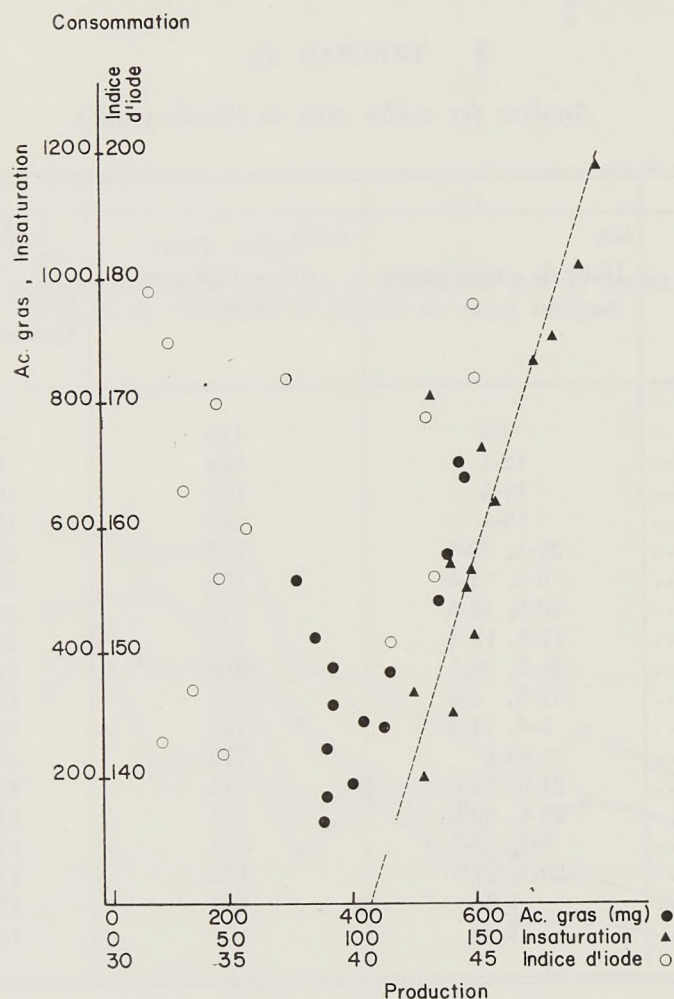


FIG. 22. — Comparaison entre :

- l'indice d'iode des acides gras de l'herbe et l'indice d'iode du beurre
- la consommation d'acides gras et la sécrétion de matière grasse
- l'insaturation globale des acides gras consommés et l'insaturation globale de la matière grasse sécrétée

B. — BILAN AU NIVEAU DES ACIDES GRAS

Nous présenterons dans le tableau 23 les résultats de l'analyse des acides gras des divers échantillons d'herbe.

Les résultats de l'analyse des acides polyinsaturés des échantillons de beurre sont présentés de la même façon que nous l'avons fait antérieurement (tabl. 24).

a) *Acides polyinsaturés de l'herbe*

Les acides linoléique et l'oléique constituent la majeure partie des acides polyinsaturés de l'herbe (figure 23).

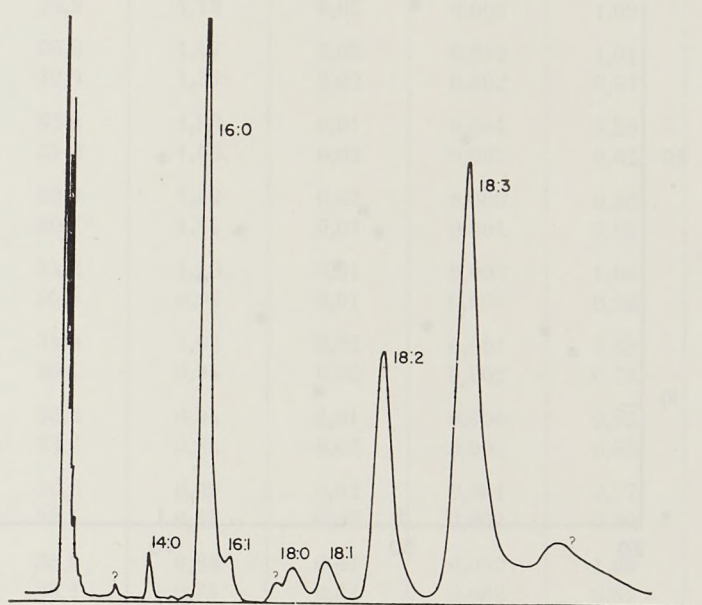


FIG. 23. — Esters méthyliques des acides gras de l'herbe n° 17

α) *Acide linoléique.*

La teneur en acide linoléique varie pendant la période expérimentale ; les teneurs les plus élevées sont observées pendant l'été spécialement en juillet 1960. Les teneurs les plus basses sont observées en juin.

β) *Acide linoléique.*

La teneur en acide linoléique de l'herbe (en p. 100 des acides totaux) varie également en fonction de la saison, les teneurs les plus élevées (près de 30 p. 100) ont été observées à la mi-mai et à la mi-juin. Les teneurs les plus basses sont voisines de 10 p. 100. La teneur moyenne est de 17,6 p. 100.

Les taux d'acide linoléique et d'acide linoléique ne sont pas liés entre eux, comme il est possible de l'observer sur la figure 24. Il semble cependant que l'écart entre la teneur en acide diène et la teneur en acide triène soit particulièrement accentué pendant le printemps et l'automne, lorsque le taux d'acide triène est élevé.

b) *Indice d'iode et acides polyinsaturés du beurre*

Les taux d'acides polyinsaturés sont présentés en détail, distinguant les acides conjugués et non conjugués ; nous avons maintes fois déterminé ces taux au cours de multiples analyses indépendantes de celles qui sont actuellement rapportées et il nous est relativement facile de saisir les variations susceptibles d'être relevées.

Nous notons donc un indice d'iode généralement un peu plus élevé le soir que le matin, restant relativement bas pendant la période d'avril à juillet, par rapport

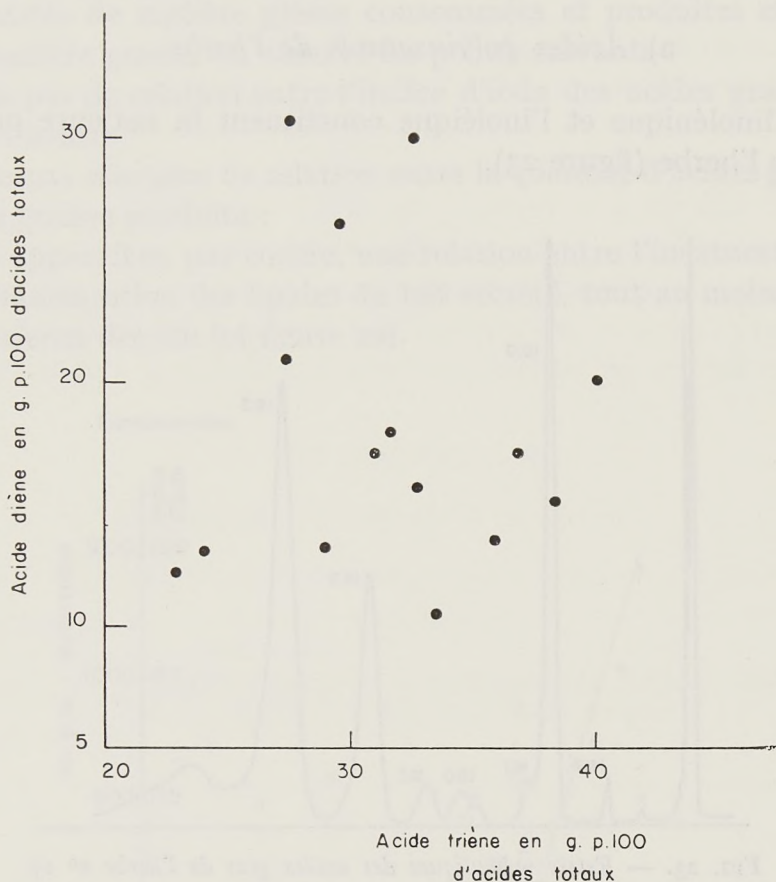


FIG. 24. — *Relation entre les taux d'acide diène et d'acide triène dans l'herbe (cf. tabl. 23)*

à ce qui est habituellement observé. Cependant en juillet, puis en septembre et octobre, l'indice d'iode atteint une valeur voisine de 45,0.

L'acide diène conjugué varie approximativement dans le même sens que l'indice d'iode : taux un peu plus élevé le soir que le matin et taux élevé de juillet à l'automne.

L'acide diène non conjugué qui correspond en majeure partie à l'acide linoléique reste au même taux, voisin de 1 p. 100 tout le temps de la période expérimentale. Cependant on note fin avril et début mai des teneurs relativement faibles (voisines de 0,6-0,7). Ces teneurs faibles, s'accompagnent de teneurs également faibles, par rapport à ce que l'on observe généralement sur les beurres frais, de l'acide tétraène non conjugué. Pour ce dernier acide la teneur moyenne observée est de 0,3, valeur correspondant à celle habituellement signalée par d'autres auteurs (RIEL (85), 1963).

Le taux de l'acide triène non conjugué présente une notable variation. Ce taux voisin de 0,4-0,5-0,6 d'avril à juin s'élève en juillet et vers la fin de l'été atteignant alors 0,8 p. 100.

TABLEAU 24

Analyse des échantillons de beurre. Acides polyinsaturés (1960)

Date des prélèvements	Indice d'iode	Conjugués			Non conjugués		
		Diènes	Triènes	Tétraènes	Diènes	Triènes	Tétraènes
7-4 soir	27,5	0,61	0,02	0	1,10	0,43	0,32
8-4 matin	25,8	0,58	0,01	0,001	1,13	0,42	0,29
15-4 soir	32,5	1,19	0,01	0	0,98	0,63	0,27
16-4 matin	33,9	1,18	0,02	0,003	1,09	0,62	0,16
21-4 soir	36,6	1,47	0,02	0,002	1,01	0,55	0,20
22-4 matin	32,8	1,37	0,02	0,002	0,87	0,50	0,21
28-4 soir	32,8	1,32	0,01	0,004	0,58	0,65	0,24
29-4 matin	34,2	1,43	0,02	0,007	0,67	0,62	0,17
5-5 soir	32,9	1,12	0,02	0,006	0,60	0,54	0,22
6-5 matin	30,7	1,14	0,01	0,004	0,81	0,47	0,29
12-5 soir	34,2	1,10	0,01	0,003	1,06	0,47	0,37
13-5 matin	30,4	0,92	0,01	0,004	0,98	0,39	0,37
19-5 soir	34,9	1,03	0,02	0,001	0,69	0,44	0,37
20-5 matin	30,4	0,95	0,02	0,002	0,73	0,39	0,30
27-5 soir	36,8	0,94	0,01	0,006	0,95	0,52	0,30
28-5 matin	33,6	0,84	0,02	0,004	0,85	0,51	0,36
2-6 soir	36,0	0,89	0,02	0,001	0,77	0,43	0,44
3-6 matin	33,4	0,82	0,02	0,001	0,99	0,50	0,35
9-6 soir	35,6	0,83	0,01	0,002	1,00	0,38	0,39
10-6 matin	36,1	0,75	0,01	0,002	0,87	0,41	0,42
16-6 soir	38,2	1,10	0,01	0,002	0,96	0,52	0,34
17-6 matin	36,6	0,98	0,01	0	0,84	0,45	0,32
23-6 soir	34,9	0,96	0,01	0	1,01	0,37	0,29
24-6 matin	34,7	0,91	0,01	0,001	0,91	0,36	0,28
30-6 soir	40,5	1,08	0,01	0	1,10	0,38	0,32
1-7 matin	42,7	1,19	0,01	0,002	0,91	0,46	0,28
7-7 soir	44,5	1,84	0,01	0,001	0,97	0,55	0,29
8-7 matin	45,4	1,86	0,01	0,002	0,78	0,56	0,21
21-7 soir	45,4	2,19	0,01	0,003	1,26	0,76	0,31
22-7 matin	44,6	2,23	0,01	0,001	1,23	0,72	0,32
5-9 soir	43,6	1,90	0,01	0,001	1,06	0,77	0,25
6-9 matin	42,3	1,90	0,01	0,005	1,16	0,82	0,19
5-10 soir	44,3	2,19	0,01	0,003	0,69	0,68	0,23
6-10 matin	42,4	2,06	0,01	0,003	0,83	0,63	0,27

Les variations déjà maintes fois notées pendant la période qui s'étend de la mise à l'herbe de printemps au début de l'automne se retrouvent donc ici encore mais apparaissent un peu atténuées par rapport à ce qui est habituellement observé.

c) *Étude comparée des acides gras de l'herbe
et des acides gras du beurre*

Les comparaisons ont été établies au niveau des quantités d'acides gras consommés et produits.

Les données à partir desquelles les différentes relations dont nous allons parler peuvent être établies ont été rassemblées dans les tableaux 25 et 26. Nous avons

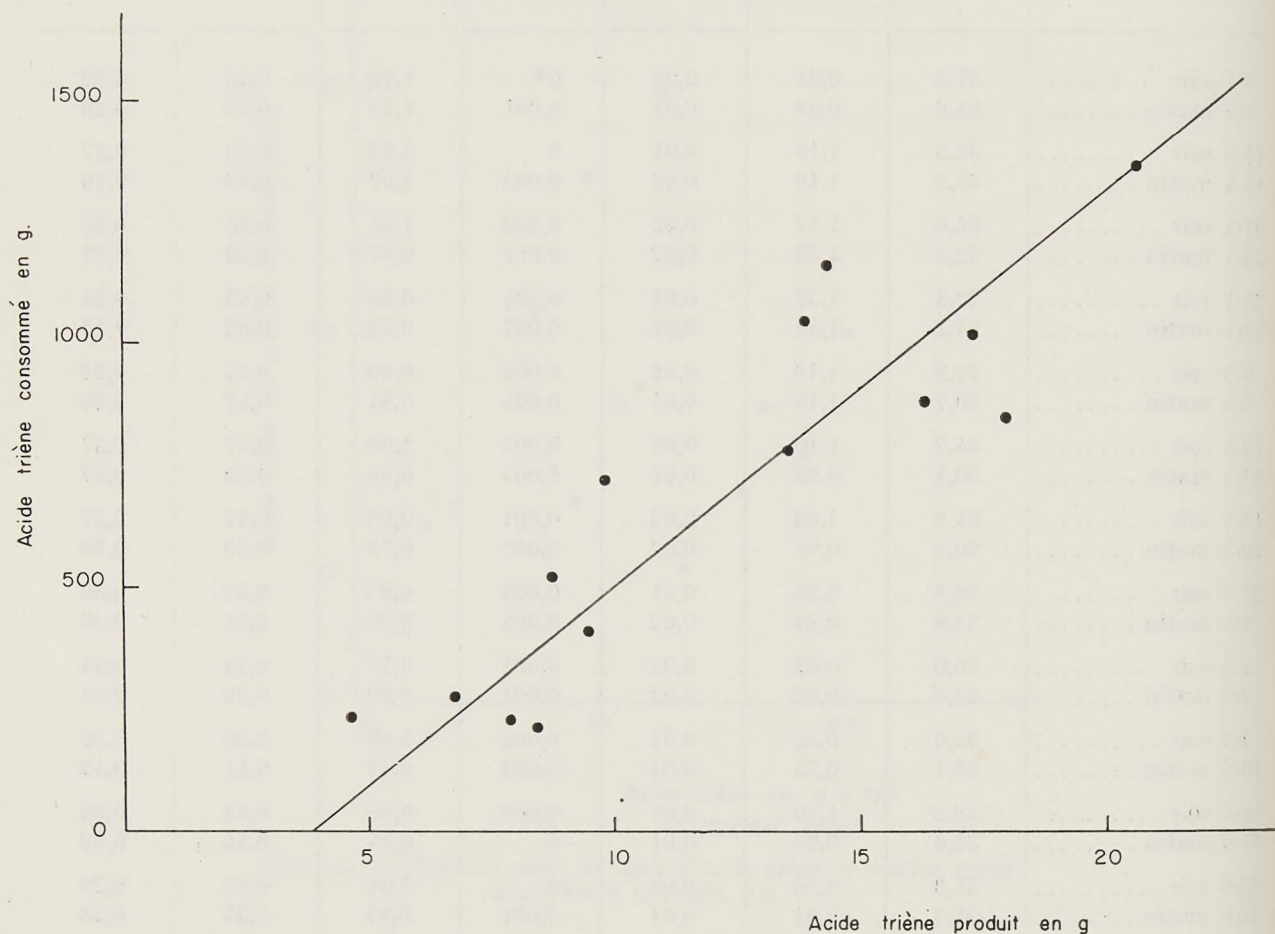


FIG. 25. — Relation entre la quantité d'acide triène consommé par le troupeau et la quantité d'acide triène produit dans le beurre (cf. tabl. 25 et 26)

calculé les quantités d'acides diènes et triènes consommées en moyenne, par vache et par le troupeau, les jours J. Nous avons également calculé les quantités d'acides diènes et triènes non conjugués et diènes conjugués produites par vache et par le troupeau les jours J + 1.

α) *Acide linoléinique.*

La figure 25 montre la relation qui existe entre la quantité d'acide linoléinique trouvée dans le lait produit et la quantité d'acide linoléinique consommée. Une droite de régression peut être tracée (figure 25). Les valeurs, acide linoléinique de l'herbe, acide linoléinique du beurre sont donc liées.

TABLEAU 25

Consommation (1960)

N° des échantillons d'herbe	Dates des jours J	Acides totaux			Acides diènes		
		Taux d'acides totaux dans l'herbe (en g p. 100 d'extrait sec)	Consommation d'acides gras totaux les jours J (en g)		Taux d'acides diènes dans l'herbe (en g p. 100 g des acides totaux)	Consommation d'acides diènes les jours J (en g)	
			par le troupeau	par vache		par le troupeau	par vache
3	4-4	5,8	2796	559	10,6	297	59
4	20-4	5,9	3527	705	15,9	560	112
5	27-4	5,7	3459	692	13,6	470	94
6	4-5	3,7	2416	483	18,0	436	87
7	11-5	3,1	1863	373	14,9	277	55
8	18-5	2,1	1409	282	26,9	379	76
9	26-5	—	—	—	31,2	—	—
10	1-6	1,5	640	128	13,8	88	18
11	8-6	1,9	971	194	13,2	128	26
12	15-6	2,5	1605	321	30,1	480	96
13	22-6	2,4	1212	242	12,5	151	30
14	29-6	3,1	858	172	21,0	179	60
15	6-7	4,4	2305	288	17,0	391	49
16	20-7	4,2	3403	425	19,3	686	86
17	3-9	3,6	2654	379	17,2	456	65
18	5-10	4,7	3643	520	14,9	542	77

β) *Acide linoléique.*

La même recherche est effectuée en ce qui concerne l'acide linoléique de l'herbe et l'acide linoléique (diène non conjugué) du beurre (fig 26). Mais dans ce cas aucune droite de régression n'apparaît. La teneur en acide linoléique du beurre n'est pas liée à la quantité de cet acide dans l'herbe consommée.

γ) *Acide diène conjugué.*

Cet acide dont la quantité notable dans le beurre est un fait remarquable est-il formé au cours de l'hydrogénation de l'acide linoléique ou au cours de l'hydrogénation de l'acide linoléique de l'herbe ?

La relation diène conjugué du beurre et acide linoléique de l'herbe et la relation diène conjugué du beurre et acide linoléique de l'herbe ont été successivement étudiées (figures 27 et 28).

La quantité d'acide diène conjugué présente dans le lait ou le beurre semble liée à la fois à la quantité d'acide linoléique et à la quantité d'acide linoléique consommées. Ces deux dernières valeurs n'étant pas liées entre elles (figure 24) l'acide diène conjugué semblerait donc pouvoir être produit au cours de l'hydrogénation portant sur l'un ou l'autre des acides polyinsaturés : l'origine « acide linoléique » apparaissant cependant nettement prépondérante.

TABLEAU 25 (suite)

N° des échantillons d'herbe	Dates des jours J	Acides triènes		
		Taux d'acides triènes dans l'herbe (en g p. 100 g d'acides totaux)	Consommation d'acides triènes les jours J (en g)	
			par le troupeau.	par vache
3	4-4	31,5	882	176
4	20-4	32,9	1158	232
5	27-4	29,2	1010	202
6	4-5	32,0	770	154
7	11-5	38,4	712	142
8	18-5	29,4	445	83
9	26-5	27,4	—	—
10	1-6	34,0	218	44
11	8-6	24,2	234	47
12	15-6	32,8	523	104
13	22-6	23,0	278	56
14	29-6	27,5	237	80
15	6-7	37,1	851	106
16	20-7	40,0	1327	170
17	3-9	31,0	822	117
18	5-10	29,0	1056	132

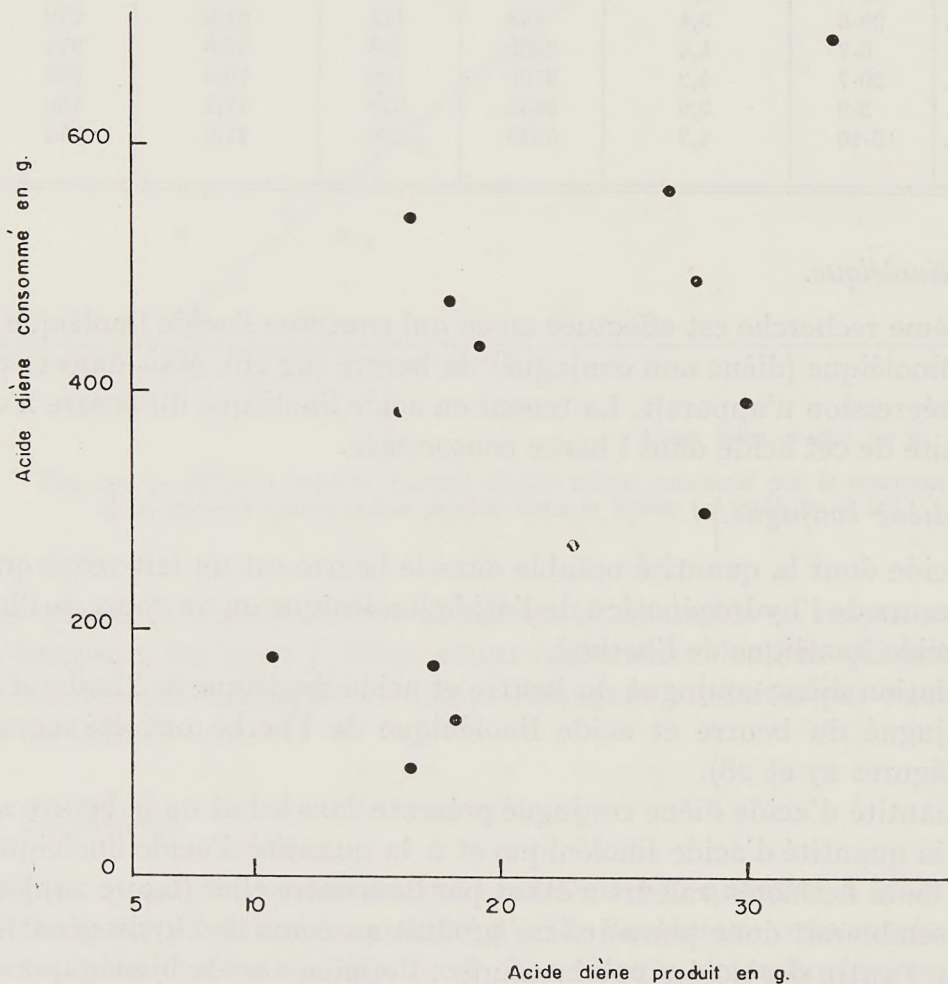


FIG. 26. — Relation entre la quantité d'acide diène consommé par le troupeau et la quantité d'acide diène produit dans le beurre (cf. tabl. 25 et 26)

TABLEAU 26

Production (1960)

Dates des prélèvements du lait	Matière grasse		Acides diènes					
	Production de matière grasse dans le lait les jours J + 1 + 2 (en g)		Non conjugués			Conjugués		
			Taux d'ac. gr. diènes non conj. (en g p. 100 g M. G.)	Production d'ac. diènes non conj. dans le lait les jours J + 1 + 2 (en g)		Taux d'ac. diènes conj. dans le beur- re (en g p. 100 g M. G.)	Production d'ac. diènes conj. dans le lait les jours J + 1 + 2 (en g)	
	par le troupeau	par vache		par le troupeau	par vache		par le troupeau	par vache
15, 16-4.....	2720	544	1,04	28,3	5,7	1,20	32,6	6,5
21, 22-4.....	2841	568	0,94	27,0	5,4	1,42	40,3	9,0
28, 29-4.....	2885	577	0,62	17,9	3,6	1,37	39,5	8,0
5, 6-5.....	2712	542	0,70	19,0	3,8	1,13	30,6	6,1
12, 13-5.....	2294	459	1,02	23,3	4,7	1,01	22,9	4,6
19, 20-5.....	2257	451	0,71	16,0	3,2	1,00	22,6	4,5
27, 28-5.....	2075	415	0,90	18,6	3,7	0,89	18,6	3,7
2, 3-6.....	1856	371	0,88	16,4	3,3	0,85	15,8	3,2
9, 10-6.....	1974	395	0,92	18,1	3,6	0,80	15,8	3,1
16, 17-6.....	1863	373	0,90	16,7	3,3	1,05	19,5	3,9
23, 24-6.....	1800	360	0,96	17,3	3,5	0,94	16,9	3,4
30-6, 1-7.....	1082	360	1,00	10,8	3,6	1,15	12,4	4,1
7, 8-7.....	3297	412	0,90	29,7	3,7	1,85	61,0	7,6
21, 22-7.....	2725	340	1,24	33,7	4,2	2,20	59,8	7,5
5, 6-9.....	2566	366	1,10	28,1	4,0	1,90	48,5	7,0
6, 7-10.....	2151	307	0,76	16,3	2,3	2,13	45,8	6,5

IV. — Discussion

L'acide diène conjugué n'existe pas dans les lipides de l'herbe — nous venons de le montrer — non plus que les acides à configuration *trans* (HARTMAN et *al.* (40, 41, 1954, 1956), non plus que l'acide vaccénique — BROUWER et JONKER-SCHAEFFENER (13), 1946). Les acides palmitique, linoléique et linolénique sont les seuls acides gras majeurs.

Nous avons constaté quelques variations au niveau des taux respectifs des acides linoléique et linolénique, en fonction du stade de croissance de l'herbe ; lorsque ces taux sont exprimés non plus en pourcentage des acides gras totaux mais en pourcentage du poids sec d'herbe, les variations apparaissent plus nettement. La consommation des vaches laitières en acide linolénique a été nettement moindre pendant le mois de juin. Or nous avons montré que l'apport d'acide linolénique dans la

ration des vaches laitières était directement responsable de l'augmentation du taux d'acide oléique (indiquée par l'augmentation de l'indice d'iode), du taux d'acide diène conjugué et du taux d'acide linoléique dans la matière grasse du beurre. Précisément, les études relatives aux variations saisonnières rappelées dans l'introduction ont montré vers la fin du printemps — début de l'été — l'existence fréquente d'une diminution ou d'un ralentissement de l'augmentation de l'indice d'iode.

Une remarque semblable peut être faite au niveau du taux d'acide diène conjugué et du taux d'acide linoléique du beurre.

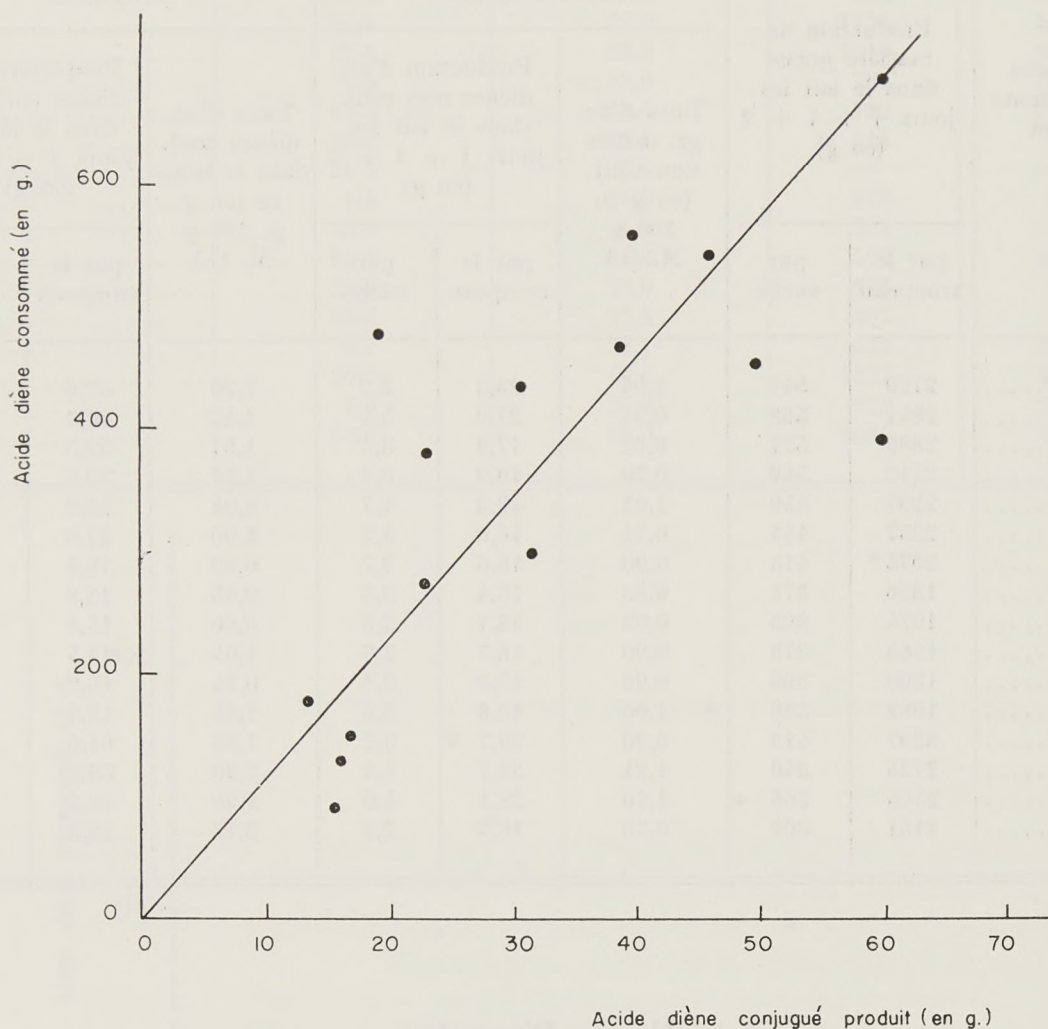


FIG. 27. — Relation entre la quantité d'acide diène consommé par le troupeau et la quantité d'acide diène conjugué produit dans le beurre (cf. tabl. 25 et 26)

Par ailleurs on a également noté une diminution régulière de l'« acide vaccénique » approximativement aux mêmes époques (se reporter à la 1^{re} partie, chapitre III).

Tout ceci prouve que les modifications entraînées au niveau de la composition des acides gras du beurre par l'introduction d'herbe dans l'alimentation des vaches laitières sont dues principalement aux variations de l'apport d'acide linoléique dans la ration.

L'acide linoléique introduit dans la ration en même temps que l'acide linoléique mais en moindre proportion, n'apparaît pas aussi directement responsable des modifications observées au niveau de la matière grasse du beurre. D'ailleurs, le taux d'acide linoléique du beurre varie relativement peu au cours de l'année.

TABLEAU 26 (suite)

Dates des prélèvements	Acides triènes		
	Taux d'acides triènes dans le beurre (en g p. 100 g M. G.)	Production d'acides triènes dans le lait les jours J + 1 + 2 (en g)	
		par le troupeau	par vache
15, 16-4.....	0,62	16,3	3,3
21, 22-4.....	0,57	14,2	2,8
28, 29-4.....	0,63	17,3	3,5
5, 6-5.....	0,50	13,5	2,7
12, 13-5.....	0,43	9,8	2,0
19, 20-5.....	0,42	9,5	1,9
27, 28-5.....	0,52	10,3	2,1
2, 3-6.....	0,46	8,5	1,7
9, 10-6.....	0,40	7,8	1,6
16, 17-6.....	0,47	8,7	1,7
23, 24-6.....	0,37	6,6	1,3
30-6, 1-7.....	0,42	4,5	1,5
7, 8-7.....	0,55	18,1	1,3
21, 22-7.....	0,74	20,7	2,6
5, 6-9.....	0,80	20,5	2,9
6, 7-10.....	0,65	13,9	2,0

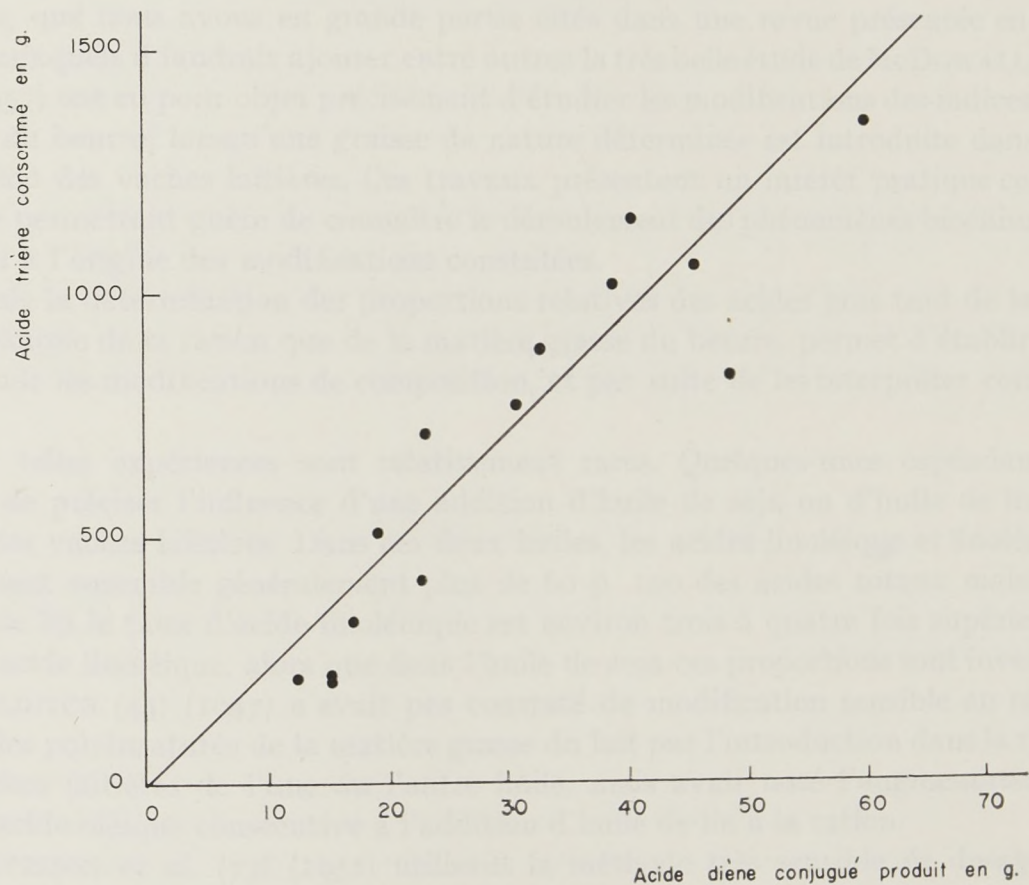


FIG. 28. — Relation entre la quantité d'acide triène consommé par le troupeau et la quantité d'acide diène conjugué produit dans le beurre (cf. tabl. 25 et 26)

Nous savons que la glande mammaire synthétise principalement les acides gras saturés. Connaissant, par ailleurs, la possibilité du passage des acides gras de la ration dans le lait, si l'on désire augmenter l'indice d'iode du beurre dans une période de grande production laitière, il pourrait être utile d'augmenter l'insaturation des lipides de la ration. Pendant la période de grande production laitière du printemps et même de l'été, cela est réalisé naturellement du fait de la quantité relativement importante d'acides gras contenus dans l'herbe, souvent seul élément de la ration, mais, pendant l'hiver, le taux des lipides de la ration est souvent faible et l'insaturation de ces lipides n'est pas toujours connue.

Il serait intéressant par ailleurs, d'étudier de manière plus approfondie le processus d'hydrogénation au niveau du rumen. Jusqu'ici les résultats seuls ont été examinés, et on ignore encore l'intimité du phénomène : la nature et le site des systèmes enzymatiques en cause. Or la constitution en acides gras de la graisse du lait des ruminants est en grande partie fixée à ce niveau.

CHAPITRE III

INTRODUCTION DE TOURTEAUX OU DE CONCENTRÉS
DANS LE RÉGIME. CONSTITUTION DE LEURS LIPIDES.
RÉPERCUSSION SUR CEUX DU BEURRE

I. — Introduction

Lorsque l'on désire connaître dans quelle mesure la composition des lipides du beurre est le reflet de la composition des lipides de la ration, la détermination des indices classiques ne peut conduire qu'à des résultats approximatifs. De nombreux travaux, que nous avons en grande partie cités dans une revue présentée en 1959 (59) et auxquels il faudrait ajouter entre autres la très belle étude de McDOWALL et *al.* (21) (1957) ont eu pour objet précisément d'étudier les modifications des indices de la graisse du beurre, lorsqu'une graisse de nature déterminée est introduite dans l'alimentation des vaches laitières. Ces travaux présentent un intérêt pratique certain, mais ne permettent guère de connaître le déroulement des phénomènes biochimiques qui sont à l'origine des modifications constatées.

Seule la détermination des proportions relatives des acides gras tant de la fraction lipidique de la ration que de la matière grasse du beurre, permet d'établir avec exactitude les modifications de composition, et par suite de les interpréter correctement.

De telles expériences sont relativement rares. Quelques-unes cependant ont permis de préciser l'influence d'une addition d'huile de soja ou d'huile de lin à la ration des vaches laitières. Dans ces deux huiles, les acides linoléique et linolénique constituent ensemble généralement plus de 60 p. 100 des acides totaux mais dans l'huile de lin le taux d'acide linolénique est environ trois à quatre fois supérieur au taux d'acide linoléique, alors que dans l'huile de soja ces proportions sont inversées.

HILDITCH (44) (1947) n'avait pas constaté de modification sensible au niveau des acides polyinsaturés de la matière grasse du lait par l'introduction dans la ration des vaches laitières de l'une ou l'autre huile, mais avait noté l'augmentation du taux d'acide oléique consécutive à l'addition d'huile de lin à la ration.

MATTSSON et *al.* (73) (1951) utilisant la méthode très sensible de dosage des acides polyinsaturés par spectrophotométrie, ont précisé les variations de ces acides dans la graisse du lait. Celles-ci peuvent se résumer ainsi : l'huile de lin entraîne une

augmentation nette du taux d'acide diène conjugué et très faible du taux d'acide linoléique du beurre ; l'huile de soja entraîne une seule modification, l'augmentation du taux d'acide linoléique. Cependant cette augmentation apparaît très faible (0,9 à 3,4 p. 100 des acides totaux) compte tenu de la très grande quantité d'huile distribuée : 3,5 à 4 kg de cosse de soja soit environ 2 kg d'huile par jour et par vache, soit très approximativement 1 kg d'acide linoléique, si nous interprétons correctement les indications données par les auteurs.

Nous présenterons ci-après quatre expériences personnelles réalisées en vue de préciser la répercussion des modifications de la nature des lipides de la ration, sur la nature des acides gras du lait ; nous nous sommes également particulièrement intéressés aux acides polyinsaturés. En effet nous souhaitions pouvoir préciser les conditions d'alimentation permettant d'augmenter le taux d'acide linoléique dans le lait ; inversement, la recherche des conditions d'alimentation des vaches laitières permettant de diminuer le taux des acides polyinsaturés de la matière grasse du lait pouvait présenter un intérêt technologique, en permettant d'obtenir un beurre moins vulnérable à l'oxydation.

Les modalités expérimentales des 4 expériences seront maintenant décrites. Les méthodes analytiques utilisées seront étudiées ensuite. Enfin les résultats seront présentés et repris en une discussion générale relative aux phénomènes de transfert des acides gras et d'hydrogénation au niveau du rumen.

II. — Matériel et méthodes

A. — NATURE DES GRAISSES UTILISÉES ET COMPOSITION DES RÉGIMES

Les suppléments lipidiques furent successivement constitués par de la graisse de coprah, de l'huile de soja, de l'huile de lin et du suif. Les trois premiers furent distribués sous forme de tourteaux gras ⁽¹⁾ (à 20 p. 100 environ de matière grasse) et le suif sous forme d'un concentré enrichi en suif préparé à la Station de Recherches sur l'Élevage (grand moulin expérimental de la Minière, Centre National de Recherches Zootechniques, Jouy-en-Josas).

B. — TROUPEAUX EXPÉRIMENTAUX

L'importance des troupeaux expérimentaux est totalement différente d'une expérience à une autre.

Expérience « Coprah ».

Dans deux villages du Jura, Myon en altitude, Marnoz en plaine, on constitua trois troupeaux de vaches laitières : un troupeau témoin et deux troupeaux expérimentaux (I et II). Chaque troupeau comptait environ 60 vaches. C'est donc sur un trou-

(1) Fournis par les Établissements Unipol, à Marseille, que nous remercions.

peau global de près de 360 vaches que porta l'expérimentation. Les vaches étaient au pâturage et le tourteau de coprah constituait un supplément d'alimentation.

Expérience « Soja » et « Lin ».

Deux vaches de race *Frisonne*, de même âge, à un même stade de lactation furent successivement utilisées pour les deux expériences, conduites à deux périodes

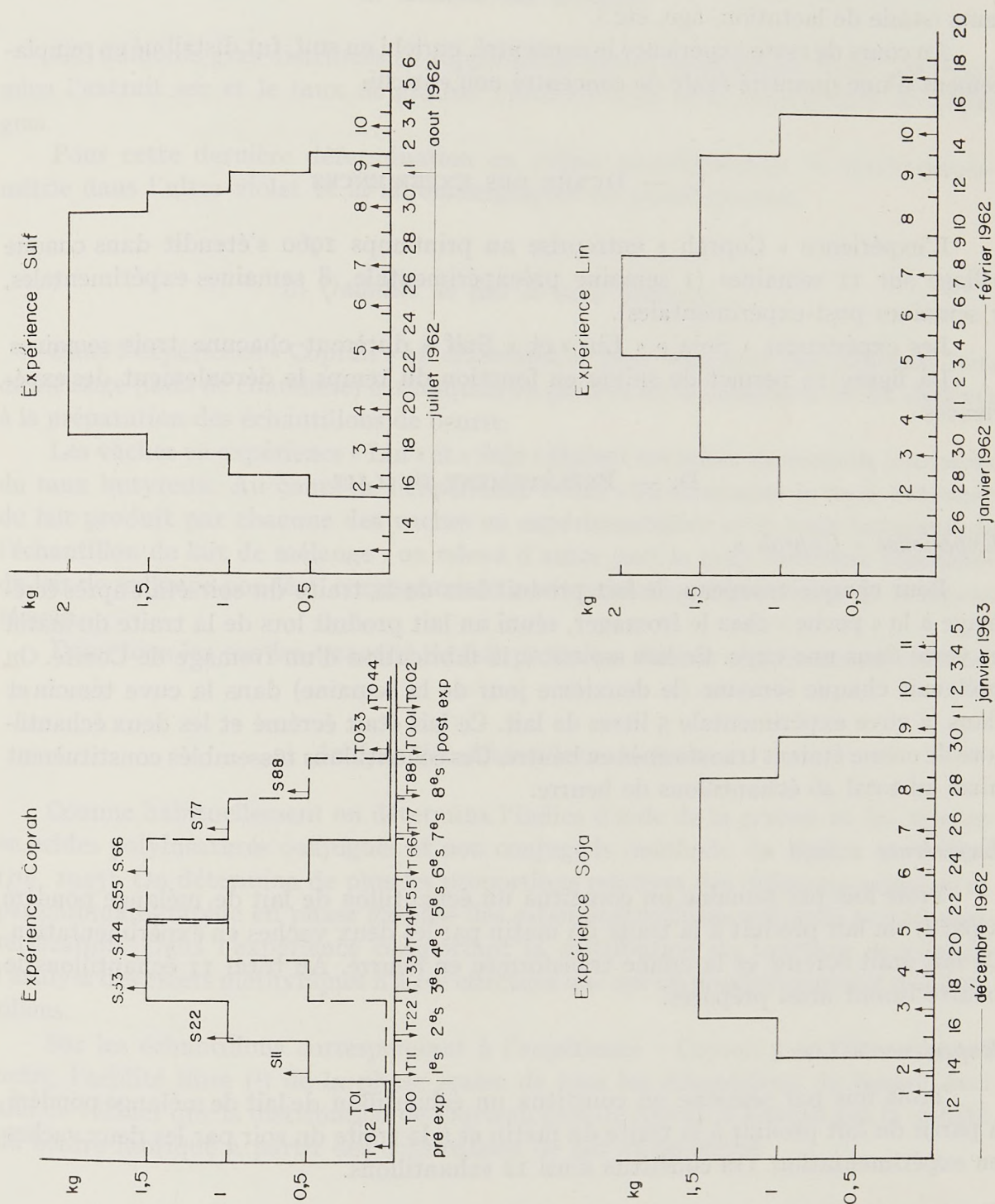


FIG. 29. — Déroulement des expérimentations

Les flèches indiquent les dates des prélèvements de lait. Les périodes expérimentales ont une durée variable. En ordonnée sont portées les quantités des tourteaux gras distribués, ou du concentré additionné de suif

différentes. Les tourteaux furent distribués comme supplément d'alimentation. Le régime de base était uniforme.

Expérience « Suif ».

Deux troupeaux, un troupeau témoin et un troupeau expérimental, comptant chacun 4 vaches furent utilisés.

Les animaux étaient choisis de telle façon que les deux troupeaux soient équivalents (stade de lactation, âge, etc.).

Au cours de cette expérience le concentré, enrichi en suif, fut distribué en remplacement d'une quantité égale de concentré non enrichi.

C. — DURÉE DES EXPÉRIENCES

L'expérience « Coprah » entreprise au printemps 1960 s'étendit dans chaque village sur 11 semaines (1 semaine préexpérimentale, 8 semaines expérimentales, 2 semaines post-expérimentales).

Les expériences « Soja' » « Lin » et « Suif » durèrent chacune trois semaines.

La figure 29 permet de suivre en fonction du temps le déroulement des expériences.

D. — PRÉLÈVEMENT DE LAIT

Expérience « Coprah ».

Pour chaque troupeau, le lait produit lors de la traite du soir était après écrémage à la « poche » chez le fromager, réuni au lait produit lors de la traite du matin et versé dans une cuve. Ce lait servait à la fabrication d'un fromage de Comté. On prélevait chaque semaine (le deuxième jour de la semaine) dans la cuve témoin et dans la cuve expérimentale 5 litres de lait. Ce lait était écrémé et les deux échantillons de crème étaient transformés en beurre. Ces échantillons rassemblés constituèrent ainsi au total 46 échantillons de beurre.

Expérience « Soja ».

Trois fois par semaine on constitua un échantillon de lait de mélange pondéré à partir du lait produit à la traite du matin par les deux vaches en expérimentation. Ce lait était écrémé et la crème transformée en beurre. Au total 11 échantillons de beurre furent ainsi préparés.

Expérience « Lin ».

Trois fois par semaine on constitua un échantillon de lait de mélange pondéré à partir du lait produit à la traite du matin et à la traite du soir par les deux vaches en expérimentation. On constitua ainsi 12 échantillons.

Expérience « Suif ».

Trois fois par semaine on constitua deux échantillons pondérés de lait de mélange (un échantillon correspondant au troupeau expérimental et un échantillon corres-

pendant au troupeau témoin) provenant du lait produit lors de la traite du matin par les vaches en expérimentation. Ce lait était écrémé et la crème transformée en beurre. On constitua ainsi 10 échantillons « expérimentaux » et 10 échantillons « témoins ».

E. — MÉTHODE ANALYTIQUE

a) *Analyse des aliments*

Les aliments gras distribués en suppléments furent analysés en détail : on détermina l'extrait sec et le taux de graisse, l'indice d'iode et la constitution en acides gras.

Pour cette dernière détermination on utilisa simultanément la spectrophotométrie dans l'ultra violet et la chromatographie en phase gazeuse.

b) *Quantité de lait et taux butyreux*

Dans l'expérience « Coprah » on détermina le taux butyreux des différents laits de mélange (laits de chaudière) sur lesquels on préleva les échantillons de lait destinés à la préparation des échantillons de beurre.

Les vaches en expérience « Lin » et « Soja » étaient soumises au contrôle journalier du taux butyreux. Au cours de l'expérience « Suif » on détermina le taux butyreux du lait produit par chacune des vaches en expérimentation et le taux butyreux de l'échantillon de lait de mélange ; on releva d'autre part le taux butyreux journalier du lait de mélange pondéré, correspondant au troupeau expérimental et au troupeau témoin.

Dans tous les cas les quantités de lait produites étaient régulièrement relevées

c) *Analyse des échantillons de beurre*

Comme habituellement on détermina l'indice d'iode de la graisse et les teneurs en acides polyinsaturés conjugués et non conjugués (méthode de BRICE et SWAIN (10), 1945). On détermina de plus les proportions relatives des différents acides gras, par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques préparés par transestérification. Dans l'expérience comportant la distribution de tourteau de coprah, l'analyse des esters méthyliques n'a été effectuée que sur un nombre restreint d'échantillons.

Sur les échantillons correspondant à l'expérience « Coprah » on détermina en outre, l'acidité libre ⁽¹⁾ de la phase grasse de tous les échantillons de beurre, ceci afin de vérifier que la distribution de tourteau gras de coprah n'altérerait pas la qualité du beurre fabriqué à partir des échantillons de lait et de crème.

(1) L'acidité libre est exprimée en « indice d'acidité » (norme n°-61959 de la Fédération Internationale de Laiterie). L'indice d'acidité est le nombre de ml d'une solution normale (N/1) d'hydroxyde de sodium nécessaires pour neutraliser 100 g de graisse. Cette expression est quelque peu différente de l'expression « indice d'acide » utilisée pour les graisses en général (PAQUOT et al. (77), 1962). L'« indice d'acide » est le nombre de mg d'hydroxyde de potassium nécessaires pour neutraliser l'acidité libre de 1 g de graisse.

III. — Résultats

A. — ANALYSE DES LIPIDES PRÉSENTS DANS LES TOURTEAUX ET LE CONCENTRÉ

On considère les échantillons de tourteaux gras (coprah, lin et soja) et le concentré enrichi en suif.

Les tableaux 27 et 28 donnent les résultats de l'analyse de ces aliments : extrait sec, taux de graisse, indice d'iode de la graisse et détermination des proportions relatives des acides gras par spectrophotométrie et chromatographie en phase gazeuse.

Ces derniers résultats sont également présentés sur la figure 30.

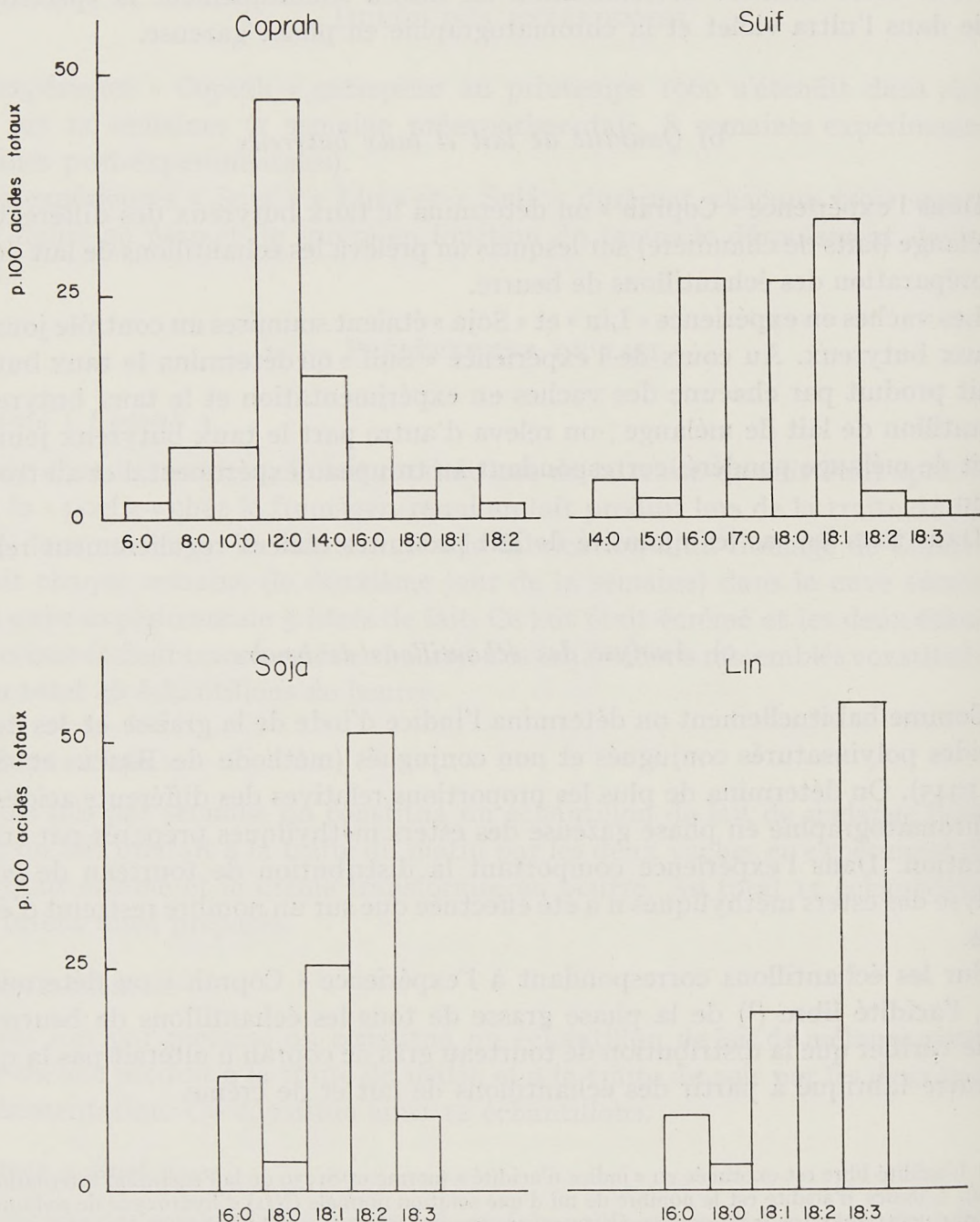


FIG. 30. — Proportions relatives des acides gras dans les huiles de soja et de lin, dans la graisse de coprah, et dans le suif utilisés au cours de l'expérimentation

On constate quelques différences entre les résultats de l'analyse spectrophotométrique et ceux de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse.

En particulier le taux d'acide linoléique déterminé par spectrophotométrie est toujours inférieur au taux de ce même acide déterminé par chromatographie en phase gazeuse. Nous avons déjà noté cette différence au sujet de l'analyse des échantillons d'herbe.

TABLEAU 27

Extrait sec de matière grasse des aliments distribués en supplément d'alimentation

Nature des échantillons	Extrait sec	Gras/sec
Coprah	87,1	22,7
Concentré suif	89,0	18,9
Soja	91,3	20,3
Lin.....	93,4	19,3

TABLEAU 28

Composition de la matière grasse des « suppléments » gras

a) Indice d'iode et acides polyinsaturés (par spectrophotométrie).

Nature des échantillons	Indice d'iode	Acides polyinsaturés					
		Conjugués			Non Conjugués		
		Diènes	Triènes	Tétraènes	Diènes	Triènes	Tétraènes
Coprah	10,0	0,10	0	0	2,22	0	0,04
Suif	38,3	0,76	0,019	0,003	0,79	0,64	0,10
Concentré suif	48,5	0,81	0,016	0,003	6,93	0,81	0,12
Soja	116,8	1,18	0,003	0	50,77	—	0,30
Lin	180,8	0,36	0,003	0	18,50	—	0,20

b) Proportions relatives des acides gras (par chromatographie en phase gazeuse) exprimées en p. 100 de la surface du chromatogramme

Nature des échantillons	C ₆	C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₅ et divers	C ₁₆	C ₁₇ et divers	C _{18 : 0}	C _{18 : 1}	C _{18 : 2}	C _{18 : 3}
Coprah	2,2	8,1	8,0	46,8	16,3		8,5		2,9	5,6	1,6	
Suif			0,1	0,1	3,4	1,8	26,6	4,3	26,4	33,1	2,7	1,5
Concentré suif ..			0,1	0,2	3,1	2,1	26,2	5,1	23,0	32,3	6,7	1,2
Soja					<i>tr</i>		12,6		2,8	25,2	51,3	8,1
Lin					<i>tr</i>		7,9		2,6	19,6	18,8	54,1

Nous notons que le suif (graisse animale) contient une notable proportion d'acides intermédiaires entre C₁₄ et C₁₆ et C₁₆ et C₁₈ que nous avons arbitrairement groupés sous les dénominations respectives C₁₅ et C₁₇ ; ces acides intermédiaires ne se retrouvent pas dans les graisses végétales.

Le taux d'acide linoléique dans le concentré enrichi en suif est nettement supérieur au taux d'acide linoléique dans le suif lui-même. Ceci montre que le concentré de base contient une graisse riche en acide linoléique. Celle-ci provient sans doute principalement de l'orge qui constitue 40 p. 100 du concentré céréales. L'analyse spectrophotométrique permet d'affirmer que ni la graisse de coprah ni les huiles de soja et de lin ne contiennent de diènes conjugués. En effet malgré les chiffres de 0,1, 0,4 ou 0,5 donnés par le calcul on n'a en aucun cas de maximum à 232 mμ avant isomérisation, seulement un palier dans le cas de l'huile de soja.

TABLEAU 29
Variation du taux butyreux du lait

	Expérience « Coprah »				Expérience « Suif »			
	Marnoz		Myon		d'après taux butyreux journalier		d'après taux butyreux des éch. de lait	
	Témoin	Expérím.	Témoin	Expérím.	Témoin	Expérím.	Témoin	Exprém.
Période hors expérience	33,7 (post expér.)	35,7 (post expér.)	32,0 (post expér.)	31,0 (post expér.)	31,6 (pré-expér.)	33,8 (pré-expér.)	31,5	33,9
Période expérimentale	30,5	33,7	31,3	31,4	32,7	33,5	32,5	36,8
Différence	— 3,2	— 2,0	— 0,7	+ 0,4	+ 1,1	— 0,3	+ 0,7	+ 2,9

	Expérience « Soja »		Expérience « Lin »	
	18 H	29 H	18 H	29 H
Période hors expérimentale	29,6	32,5	32,1	32,8
Période expérimentale	33,5	34,9	35,0	36,5
Différence	+ 3,9	+ 2,4	+ 2,9	+ 3,7

Par contre, on a observé un léger maximum à 230-232 mμ dans le cas du suif. A partir des résultats portés dans les tableaux 27 et 28, il est possible d'évaluer la quantité des différents acides gras absorbés par les vaches laitières en même temps

que le supplément d'alimentation grasse. Mais il existe des quantités importantes (et inconnues) des mêmes acides gras dans la fraction lipidique de l'alimentation de base, dont on ne tient pas compte dans le présent chapitre.

B. — TAUX BUTYREUX DU LAIT ET ANALYSE DES ÉCHANTILLONS DE BEURRE

a) Taux butyreux du lait

On a calculé les taux butyreux moyens du lait pendant la période expérimentale (correspondant à la période de distribution de l'aliment gras) et pendant les périodes pré- et post-expérimentales.

Les taux butyreux qui ont servi au calcul des moyennes portées dans le tableau 29 proviennent pour l'expérience « Coprah » des taux butyreux déterminés sur les laits de chaudière correspondant aux échantillons de crème analysés. Pour les expériences « Soja » et « Lin » les taux butyreux utilisés sont les taux butyreux

TABLEAU 30

Expérience « Coprah »
Acidité libre de la phase grasse des échantillons de beurre
 (Exprimée en ml NaOH N/1 pour 100 g de matière grasse*)
 Norme F. I. L. n° 6 : 1959

Période expérimentale	Marnoz		Myon	
	Troupeaux		Troupeaux	
	Témoin	Expérimental	Témoin	Expérimental
<i>Avant expérimentation</i>	0,86	1,01	1,14	1,29
<i>Pendant expérimentation</i>				
1 ^e semaine.....	0,92	1,46	1,16	1,40
2 ^e semaine.....	0,94	1,12	1,04	3,90
3 ^e semaine.....	0,96	1,64	1,20	1,96
4 ^e semaine.....	—	1,52	1,30	2,22
5 ^e semaine.....	0,86	1,14	0,90	2,32
6 ^e semaine.....	0,92	1,68	0,98	1,40
7 ^e semaine.....	0,86	1,24	0,80	1,22
8 ^e semaine.....	1,00	2,00	0,76	1,44
<i>Après expérimentation</i>				
9 ^e semaine.....	0,96	1,20	1,88	1,86
10 ^e semaine.....	1,84	2,24	1,06	1,26

(1) Pour exprimer l'acidité libre en g d'acide oléique pour 100 g de matière grasse, il suffit de multiplier les chiffres du tableau par 0,282.

journaliers des laits individuels (18 H et 29 H). Enfin pour l'expérience « Suit » ils proviennent d'une part des taux butyreux journaliers déterminés sur le lait de mélange correspondant au troupeau témoin et au troupeau expérimental, et d'autre part des taux butyreux du lait de mélange constitué les jours de prélèvement.

Les résultats montrent qu'il existe, le plus souvent, hors expérimentation, une différence marquée entre le taux butyreux du lait correspondant au troupeau expérimental et celui du lait correspondant au troupeau témoin. Une augmentation du taux butyreux du lait au niveau de l'un ou l'autre troupeau est alors assez difficile à mettre en évidence. Cependant, dans le cas des expériences « Soja » et « Lin », le taux butyreux moyen du lait pendant la période expérimentale est de près de 10 p. 100 supérieur au taux moyen des périodes pré- ou post-expérimentales.

b) Acidité libre de la graisse de beurre

Cette analyse n'a porté que sur les échantillons de beurre correspondant à l'expérience « Coprah ». Les résultats sont portés dans le tableau 30. On constate que la distribution du tourteau de coprah a entraîné une augmentation de l'hydrolyse initiale de la graisse sans toutefois provoquer l'apparition d'une rancidité marquée lors de l'examen organoleptique de la crème ou du beurre.

c) Composition de la graisse des échantillons de beurre

Les variations de l'indice d'iode concernant les quatre expérimentations sont groupées sur la figure 31. Les proportions relatives des différents acides gras obtenues par chromatographie en phase gazeuse et les taux des différents acides polyinsaturés déterminés par spectrophotométrie sont présentées dans des tableaux distincts, pour chacune des quatre expérimentations.

Nous étudierons successivement, les résultats concernant chacune de ces expérimentations.

TABLEAU 31

« Expérience Coprah »

Proportions relatives des acides gras de divers échantillons de beurre

Acides gras	S ₃₃ Coprah	T ₃₃ Témoin	S ₄₄ Coprah	T ₄₄ Témoin	S ₆₆ Coprah	T ₆₆ Témoin
Groupe C ₄ , C ₆	0,9	0,8	0,8	0,9	0,6	0,7
Groupe C ₈	1,3	1,2	1,1	1,7	1,4	0,9
Groupe C ₁₀	3,6	3,3	2,9	3,4	3,3	2,7
Groupe C ₁₂	10,5	3,3	10,3	5,4	11,2	2,9
Groupe C ₁₄	18,4	13,2	18,9	16,5	16,5	12,3
Groupe C ₁₆	29,3	31,1	28,7	29,2	28,5	32,6
Groupe C _{18 0}	9,2	12,1	10,6	11,4	10,9	12,1
Groupe C _{18:1} , C _{18 2} , C _{18:3}	26,8	35,0	26,7	31,5	27,6	35,9

Expérience « Coprah ».

Indice d'iode. — Hors expérimentation, les indices d'iode moyens étaient respectivement de 42,2 et de 41,8 pour le groupe expérimental et le groupe témoin à Marnoz ; ils étaient respectivement de 43,5 et de 42,1 à Myon. Pendant la période expérimentale, les indices d'iode moyens étaient de 40,8 et de 35,3 à Marnoz, de 41,9 et de 36,6 à Myon respectivement pour les groupes témoins et expérimentaux. Ainsi la distribution de coprah a nettement abaissé l'indice d'iode du beurre.

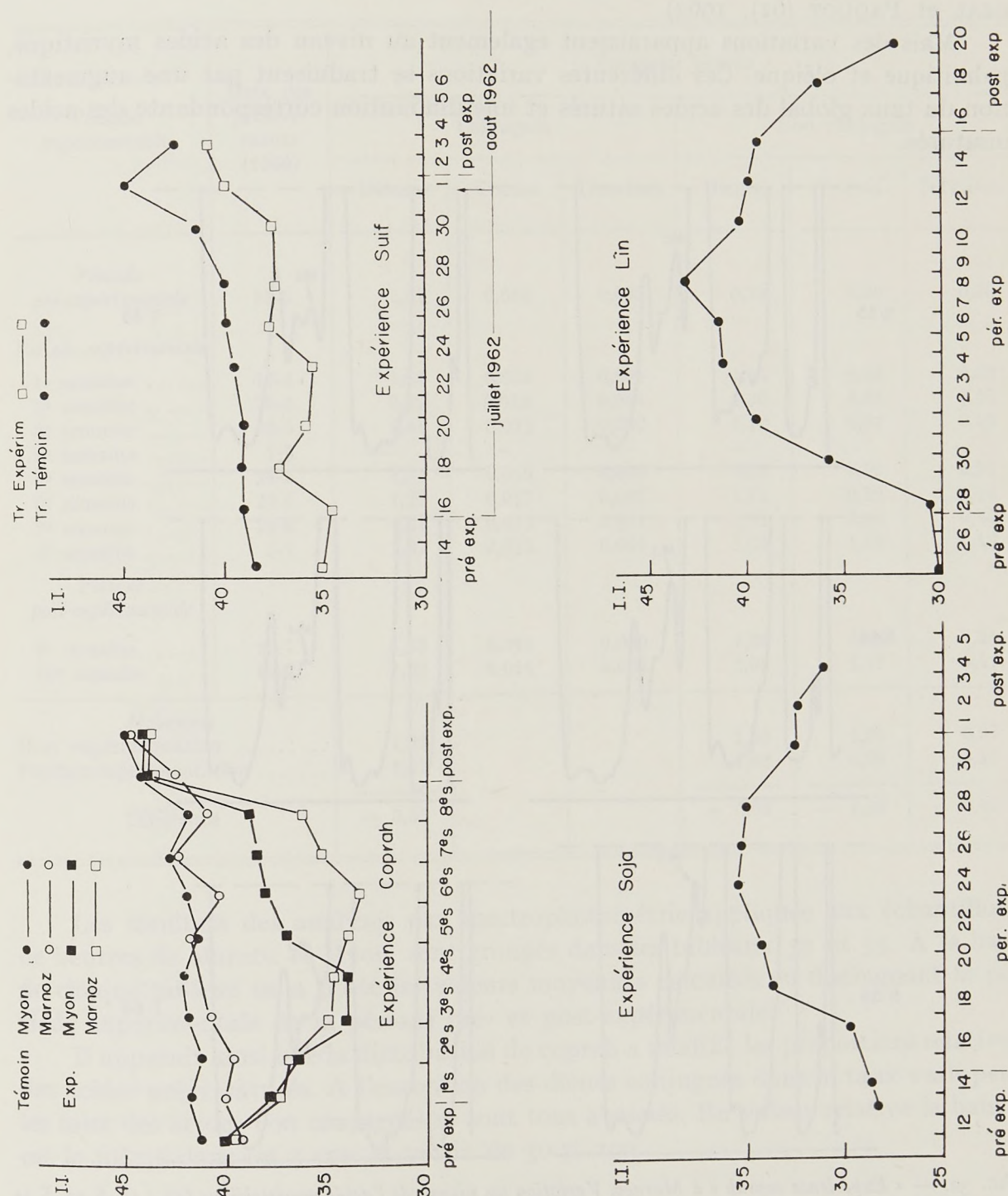


FIG. 31. — Variation de l'indice d'iode du beurre

Les analyses portent sur des échantillons de beurre fabriqué à partir des échantillons de lait prélevés au cours des quatre expérimentations dont le déroulement est indiqué sur la figure 23.

Proportions relatives des acides gras. — On a analysé par chromatographie en phase gazeuse quelques échantillons provenant de Marnoz et correspondant à la 3^e, à la 4^e et à la 6^e semaines d'expérimentation, c'est-à-dire pendant la période de distribution maximale de tourteau.

Les résultats de ces analyses sont portés dans le tableau 31.

La différence la plus marquée est celle qui concerne l'acide laurique ; la proportion de celui-ci dans le beurre expérimental est le triple de celle du beurre témoin. Nous avons d'ailleurs examiné en détail ce point dans une publication récente (KUZDZAL et PAQUOT (62), 1962).

Mais des variations apparaissent également au niveau des acides myristique, palmitique et oléique. Ces différentes variations se traduisent par une augmentation du taux global des acides saturés et une diminution correspondante des acides insaturés.

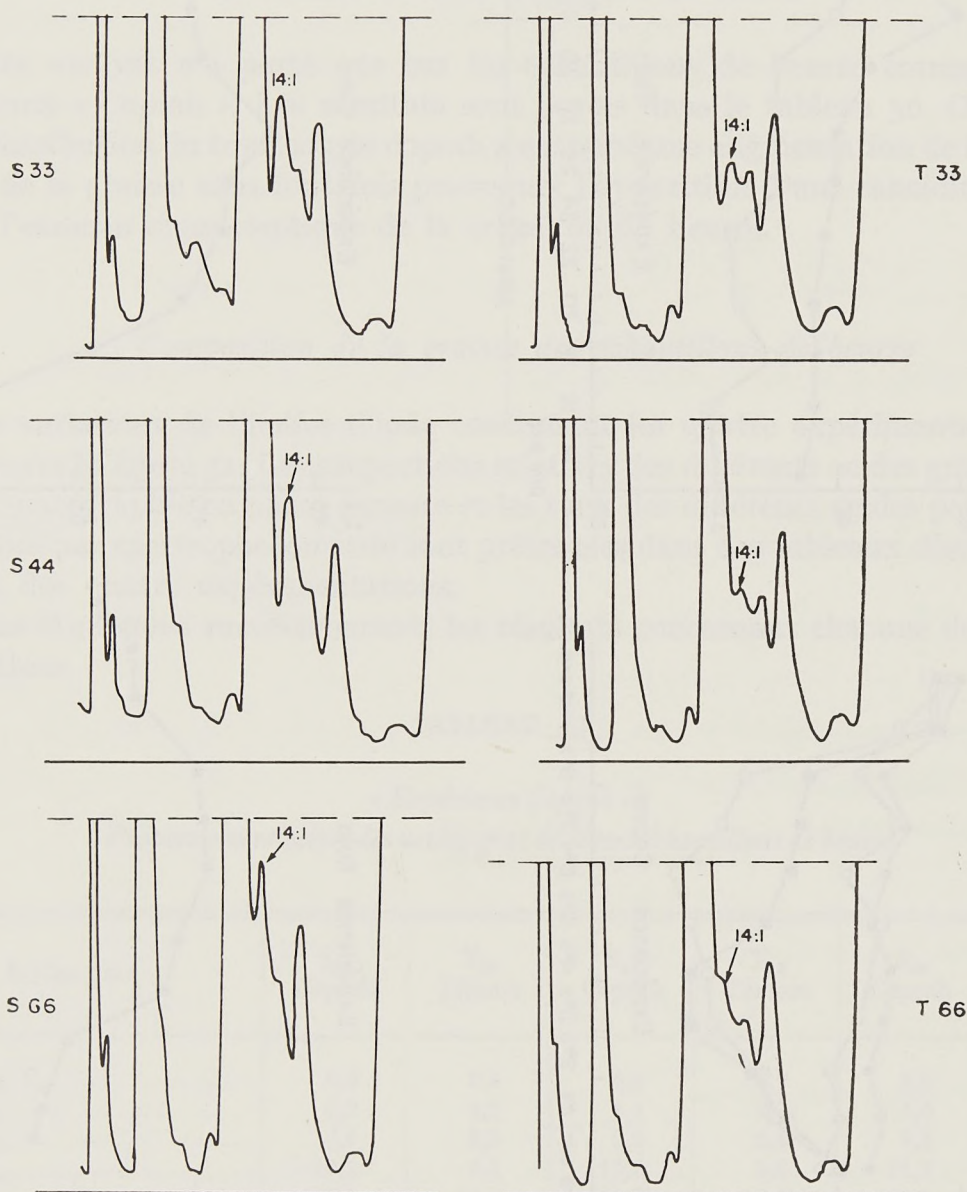


FIG. 32. — « Expérience coprah » à Marnoz. Variation au niveau de l'acide myristoléique (14 : 1). S 33, S 44 et S 66 : trois échantillons de beurre fabriqués à partir du lait produit par le troupeau expérimental, le 2^e jour de la 3^e, de la 4^e et de la 6^e semaines (distribution de 1,5 kg de tourteau gras par vache et par jour). T 33, T 44 et T 66 : trois échantillons de beurre fabriqués à partir du lait produit par le troupeau témoin les mêmes jours

On note quelques différences affectant les acides mineurs au niveau en particulier du $C_{14} : 1$. La figure 32 montre les modifications relevées sur les chromatogrammes correspondant aux échantillons témoins ou expérimentaux.

TABLEAU 32

*Expérience « Coprah »
Village de Marnoz (Jura)*

Etude des acides polyinsaturés des échantillons de beurre

Période expérimentale	Date des prélèvements (1960)	Troupeau témoin					
		Conjugués			Non conjugués		
		Diènes	Triènes	Tétraènes	Diènes	Triènes	Tétraènes
<i>Période pré-expérimentale</i>	13-5	2,31	0,016	0,003	0,79	0,90	0,36
<i>Période expérimentale</i>							
1 ^e semaine	17-5	1,61	0,018	0,001	1,44	0,98	0,33
2 ^e semaine	24-5	0,59	0,018	0,004	1,30	0,86	0,26
3 ^e semaine	31-5	1,81	0,012	0,002	1,72	0,91	0,40
4 ^e semaine	7-6	—	—	—	—	—	—
5 ^e semaine	14-6	1,31	0,019	0,000	1,65	0,99	0,52
6 ^e semaine	22-6	1,29	0,017	0,001	1,75	0,99	0,40
7 ^e semaine	28-6	1,29	0,013	0,001	1,91	0,85	0,46
8 ^e semaine	5-7	1,37	0,015	0,002	1,60	1,12	0,42
<i>Période post-expérimentale</i>							
9 ^e semaine	12-7	1,52	0,011	0,000	1,96	0,05	0,35
10 ^e semaine	19-7	1,92	0,014	0,001	2,03	1,17	0,41
<i>Moyennes</i>							
Hors expérimentation		1,92			1,59	1,04	0,37
Pendant expérimentation		1,47			1,62	0,96	0,40
Différence		— 0,35			+ 0,03	— 0,08	+ 0,03

Les résultats des analyses par spectrophotométrie appliquée aux échantillons de beurres de Marnoz et Myon, sont groupés dans les tableaux 32 et 33. A la base de chaque tableau on a porté les valeurs moyennes calculées en distinguant la période expérimentale de la période pré- et post-expérimentale.

Il apparaît ainsi que la distribution de coprah a modifié les proportions relatives des acides polyinsaturés. A l'exception des diènes conjugués dont le taux varie peu, les taux des acides non conjugués se sont tous abaissés. En valeur relative la baisse est la même dans les 3 cas, et voisin de 30 p. 100.

b) *Expérience « Soja ».*

Indice d'iode. — En distinguant la période expérimentale de la période non expérimentale on obtient une nette différence d'indice d'iode 33,7 à 30,2 et la figure 31

montre que cette différence est fonction de la quantité de soja consommé par les vaches laitières.

Proportions relatives des acides gras (tabl. 34). — L'examen du résultat des analyses par chromatographie en phase gazeuse montre que simultanément à l'augmentation de l'indice d'iode on assiste à une inversion des proportions relatives au

TABLEAU 32 (suite)

Période expérimentale	Date des prélève- ments (1960)	Troupeau expérimental					
		Conjugués			Non conjugués		
		Diènes	Triènes	Tétraènes	Diènes	Triènes	Tétraènes
<i>Période pré-expérimentale</i>	13-5	2,00	0,019	0,003	1,02	0,90	0,33
		1,85	0,017	0,002	1,33	0,88	0,36
<i>Période expérimentale</i>							
1 ^{re} semaine	17-5	1,62	0,015	0,001	1,17	0,75	0,29
2 ^e semaine	24-5	1,51	0,017	0,002	1,35	0,78	0,30
3 ^e semaine	31-5	1,53	0,011	0,001	0,93	0,63	0,28
4 ^e semaine	7-6	1,24	0,012	0,002	1,26	0,63	0,23
5 ^e semaine	14-6	1,18	0,012	0,001	1,16	0,46	0,35
6 ^e semaine	22-6	1,06	0,011	0,001	1,10	0,69	0,21
7 ^e semaine	28-6	1,17	0,009	0,003	0,99	0,55	0,30
8 ^e semaine	5-7	1,31	0,013	0,001	1,16	0,68	0,33
<i>Période post-expérimentale</i>							
9 ^e semaine	12-7	1,41	0,011	0,001	2,35	0,93	0,35
10 ^e semaine	19-7	1,75	0,013	0,001	2,10	1,18	0,42
<i>Moyennes</i>							
Hors expérimentation		1,75			1,70	0,97	0,37
Pendant expérimentation.....		1,33			1,14	0,65	0,29
Différence		— 0,42			— 0,56	— 0,32	— 0,08

niveau de certains acides gras, les acides stéarique et oléique augmentent conjointement alors que diminuent les proportions d'acides palmitique, myristique et même laurique.

Par chromatographie en phase gazeuse, on a également déterminé le taux d'acide linoléique. Cette détermination n'est pas très précise par cette méthode, lorsque le taux est de l'ordre de quelques pour cent, mais nous avons voulu les comparer aux valeurs obtenues par spectrophotométrie.

Acides polyinsaturés (tabl. 35). — Par spectrophotométrie on met en évidence une augmentation du taux d'acide linoléique très faible mais cependant notable si

TABLEAU 33

*Expérience « Coprah »
Village de Myon (Jura)*

Étude des acides polyinsaturés des échantillons de beurre

Période expérimentale	Date des prélèvements (1960)	Troupeau témoin					
		Conjugués			Non conjugués		
		Diènes	Triènes	Tétraènes	Diènes	Triènes	Tétraènes
<i>Période pré-expérimentale</i>	14-5	1,96	0,016	0,001	1,43	0,85	0,36
<i>Période expérimentale</i>							
1 ^{re} semaine	18-5	1,79	0,013	0,001	1,61	0,98	0,37
2 ^e semaine	25-5	1,77	0,012	0,001	1,68	0,99	0,40
3 ^e semaine	2-6	1,91	0,014	0,000	1,22	0,98	0,38
4 ^e semaine	9-6	1,80	0,013	0,003	1,52	1,16	0,33
5 ^e semaine	15-6	1,64	0,013	0,000	1,71	0,87	0,45
6 ^e semaine	23-6	1,51	0,011	0,002	1,85	0,53	0,42
7 ^e semaine	29-6	1,79	0,011	0,003	1,31	1,02	0,40
8 ^e semaine	7-7	1,76	0,011	0,001	1,62	1,20	0,40
<i>Période post-expérimentale</i>							
9 ^e semaine	13-7	1,58	0,011	0,001	2,09	0,79	0,43
10 ^e semaine	21-7	1,94	0,009	0,001	2,18	1,21	0,41
<i>Moyennes</i>							
Hors expérimentation		1,83			1,90	0,95	0,40
Pendant expérimentation		1,75			1,57	0,97	0,40
Différence		— 0,08			— 0,33	+ 0,02	0

on le compare aux taux se rapportant aux périodes pré- et post-expérimentales. Le taux a pratiquement doublé, passant de 1,2 p. 100 à 2,4 p. 100 au maximum. Le taux d'acide arachidonique ne semble pas avoir été modifié. Il semble apparaître une légère augmentation du taux d'acide linoléinique, celui-ci passant de 0,4 à 0,6 environ. Au niveau des acides diènes conjugués on ne constate aucune variation.

Expérience « Lin ».

Indice d'iode. — L'indice d'iode s'est élevé ici très nettement (fig. 31). Il est vrai que la quantité d'huile consommée par les vaches laitières a été relativement plus élevée que dans les autres expériences. L'indice d'iode s'est élevé de plus de 10 unités, cette augmentation s'aligne parfaitement sur l'augmentation d'huile de lin consommée.

TABLEAU 33 (suite)

Période expérimentale	Date des prélèvements (1960)	Troupeau expérimental					
		Conjugués			Non conjugués		
		Diènes	Triènes	Tétraènes	Tiènes	Briènes	Tétraènes
<i>Période pré-expérimentale</i>	1-45	1,66	0,013	0,001	1,59	0,87	0,34
		2,10	0,014	0,002	1,45	0,84	0,34
<i>Période expérimentale</i>							
1 ^{er} semaine	1-85	1,33	0,006	0,002	1,45	0,88	0,32
2 ^e semaine	25-5	1,42	0,008	0,001	1,45	0,85	0,34
3 ^e semaine	2-6	1,33	0,012	0,000	0,86	0,67	0,17
4 ^e semaine	9-6	1,26	0,007	0,002	1,13	0,66	0,27
5 ^e semaine	15-6	1,41	0,011	0,004	1,10	0,73	0,24
6 ^e semaine	23-6	1,46	0,008	0,002	1,16	0,64	0,37
7 ^e semaine	29-6	1,61	0,010	0,003	1,12	0,76	0,31
8 ^e semaine	7-7	1,53	0,011	0,000	1,10	0,66	0,31
<i>Période post-expérimentale</i>							
9 ^e semaine	13-7	1,66	0,012	0,000	2,21	0,70	0,43
10 ^e semaine	21-7	1,82	0,010	0,001	1,99	1,17	0,42
<i>Moyennes</i>							
Hors expérimentation		1,81			1,81	0,90	0,38
Pendant expérimentation		1,42			1,17	0,73	0,29
Différence		— 0,39			— 0,64	— 0,17	— 0,99

TABLEAU 34

Expérience « Soja »

Proportions relatives des acides gras dans les échantillons de beurre
(Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques).
(Résultats exprimés en % de la surface du chromatogramme).

N° des échantillons	C ₄	C ₆	C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	Groupe des C ₁₈	C _{18:0}	C _{18:1}
1	1,0	1,5	1,6	4,5	5,6	17,7	40,6	27,4	6,6	16,7
2	0,9	1,4	1,6	4,7	5,6	18,7	45,4	22,1	5,8	14,1
3	1,2	2,1	1,8	5,0	6,2	17,1	40,1	26,5	6,7	16,7
4	1,3	2,1	1,8	4,9	6,0	16,4	35,9	31,2	7,8	19,3
5	0,9	1,8	2,0	4,8	5,8	16,6	33,6	34,5	8,3	21,7
6	1,1	2,1	2,6	4,4	5,4	14,9	30,9	38,6	10,3	22,8
7	1,1	2,0	1,8	4,5	5,1	15,1	32,8	37,6	9,0	23,8
8	1,6	2,3	2,2	4,9	5,2	16,1	33,4	34,3	8,8	21,4
9	1,1	2,1	2,2	4,9	5,4	16,6	34,2	33,5	8,7	20,5
10	0,8	1,5	1,5	4,9	5,0	17,1	36,5	32,7	8,1	20,1
11	1,1	2,2	2,0	5,1	6,0	17,1	36,9	29,6	7,0	19,3

TABLEAU 35

Expérience « Soja »
Étude des acides polyinsaturés du beurre

Date des prélèvements	N° des échantillons	Quantité de tourteau distri- tribuée le jour du prélèvement (en kg)	Acides conjugués			Acides non conjugués		
			Diènes	Triènes	Tétraènes	Diènes	Triènes	Tétraènes
13-12-62	1	0	0,51	0,013	0,002	1,16	0,41	0,37
14-12-62	2	0	0,52	0,013	0,002	1,16	0,46	0,36
17-12-62	3	1,5	0,61	0,012	0,002	1,53	0,52	0,38
19-12-62	4	1,5	0,64	0,012	0,002	1,79	0,51	0,35
21-12-62	5	1,5	0,55	0,011	0,002	2,34	0,52	0,33
24-12-62	6	1,5	0,63	0,011	0,002	2,32	0,44	0,33
26-12-62	7	1,5	0,58	0,010	0,002	2,35	0,63	0,29
28-12-62	8	1,5	0,64	0,010	0,002	2,29	0,57	0,25
31-12-62	9	0	0,55	0,011	0,002	2,25	0,47	0,33
2-1-63	10	0	0,56	0,012	0,002	2,11	0,44	0,38
4-1-63	11	0	0,65	0,012	0,003	1,80	0,37	0,31
Moyennes								
Hors expérimentation.....			0,56			1,70	0,43	0,35
Pendant expérimentation			0,61			2,10	0,53	0,32
Différence			+ 0,05			+ 0,40	+ 0,10	— 0,03

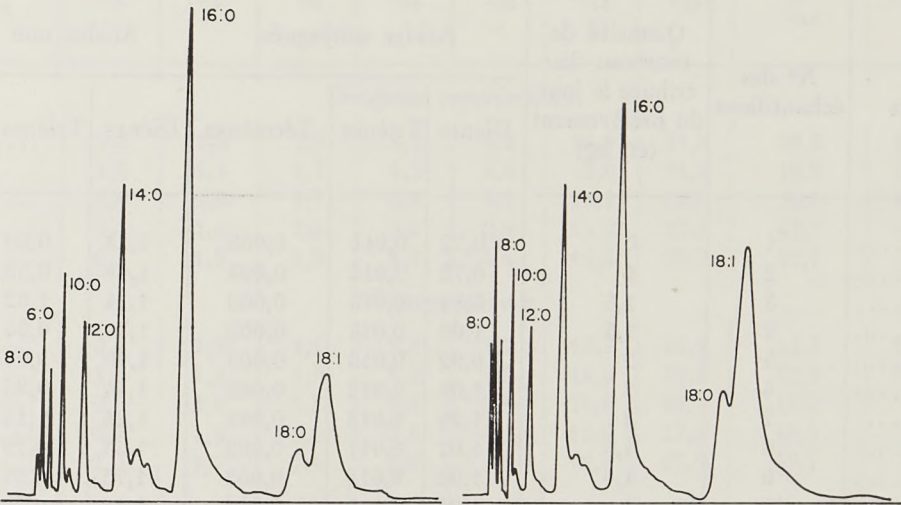


FIG. 33. — Esters méthyliques des acides gras d'échantillons de beurre, « Expérience LIN »
à gauche : beurre n° 2 — indice d'iode : 30, 3
à droite : beurre n° 7 — indice d'iode : 43,3

Proportions relatives des acides gras (tableau 36). — On observe de très nettes variations dans ces proportions relatives. On présente sur la figure 33 deux chromatogrammes correspondant aux et échantillons n° 2 n° 7. Les différences au niveau des acides gras apparaissent nettement. On note en particulier une augmentation

TABLEAU 36

Expérience « Lin »
Proportions relatives des acides gras dans les échantillons de beurre
(Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques)
(Résultats exprimés en p. 100 de la surface du chromatogramme).

N° des échantillons	C ₄	C ₆	C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	Groupe des C ₁₈	C _{18:0}	C _{18:1}
1	0,9	1,7	1,9	4,8	5,7	19,3	41,7	24,6	5,5	17,2
2.....	1,0	2,1	1,8	5,0	5,8	16,9	36,4	31,0	6,8	21,2
3.....	0,9	1,9	2,4	4,8	4,7	15,0	32,6	37,7	8,0	22,5
4.....	1,0	1,6	1,8	3,9	4,6	16,4	31,9	38,8	9,1	24,5
5.....	0,6	1,9	1,5	4,2	4,6	14,8	29,7	42,7	8,5	27,6
6.....	1,1	1,7	1,4	4,2	4,5	14,9	31,3	40,5	9,0	27,4
7.....	1,6	2,2	2,0	3,9	4,4	14,8	28,0	43,1	9,3	31,2
8.....	1,0	2,1	1,7	3,6	4,3	15,0	29,1	43,4	9,0	30,0
9.....	1,0	2,1	1,8	3,6	4,4	14,5	26,6	46,1	8,6	30,1
10.....	1,2	2,2	1,8	3,7	4,0	13,7	28,0	45,7	8,8	29,8
11.....	1,2	2,0	1,9	4,7	5,5	17,6	31,4	35,7	7,4	23,6
12.....	1,3	2,2	2,1	4,7	5,2	18,6	37,7	28,2	5,1	18,6

TABLEAU 37

Expérience « Lin »
Étude des acides polyinsaturés du beurre.

Date des prélèvements	N° des échantillons	Quantité de tourteau distribuée le jour du prélèvement (en kg)	Acides conjugués			Acides non conjugués		
			Diènes	Triènes	Tétraènes	Diènes	Triènes	Tétraènes
25-1-63	1	0	0,72	0,014	0,003	1,18	0,50	0,34
28-1-63	2	1	0,72	0,012	0,003	1,48	0,53	0,35
30-1-63	3	1,5	0,84	0,015	0,003	1,24	1,02	0,35
1-2-63	4	1,5	1,00	0,014	0,003	1,30	0,94	0,36
4-2-63	5	2	0,99	0,013	0,003	1,30	0,90	0,31
6-2-63	6	2	1,08	0,012	0,003	1,34	0,93	0,28
8-2-63	7	2	1,29	0,013	0,002	1,26	1,14	0,34
11-2-63	8	1,5	1,02	0,011	0,002	1,53	0,79	0,35
13-2-63	9	1,5	1,03	0,015	0,003	1,75	1,34	0,34
15-2-63	10	1	1,04	0,010	0,002	1,55	0,76	0,35
18-2-63	11	0	0,79	0,013	0,003	1,51	0,61	0,42
21-2-63	12	0	0,59	0,015	0,003	1,52	0,59	0,43
Moyennes								
Hors expérimentation			0,70			1,40	0,57	0,40
Pendant expérimentation			1,00			1,42	0,93	0,34
Différence			+ 0,30			+ 0,02	+ 0,36	— 0,06

importante du taux d'acide oléique et du taux d'acide stéarique à la suite de la consommation du tourteau de lin par les vaches laitières.

Acides polyinsaturés (tabl. 35). — L'analyse spectrophotométrique permet de montrer que le taux d'acide linoléique a nettement augmenté, entre l'échantillon n° 1 (indice d'iode 29,2) et l'échantillon n° 9 (indice d'iode 43,4) : il a plus que doublé. Le taux d'acide arachidonique n'a pas été modifié, le taux d'acide linoléique semble avoir quelque peu varié mais cependant valeurs les moyennes avant et après expérimentation restent très voisines. Par contre le taux de diènes conjugués a nettement augmenté, puisqu'il est passé de 0,7 environ à 1,3, lorsque l'indice d'iode atteignait la valeur maximale : 43,36.

Expérience « Suif ».

Indice d'iode. — La figure 31 montre qu'en ce qui concerne l'indice d'iode une différence existait entre les deux groupes de vaches laitières avant le départ de l'expérimentation. Cette différence s'est maintenue au cours de l'expérimentation, elle s'est cependant légèrement atténuée passant de 3,4 à 1,5.

TABLEAU 38

Expérience « Suif »

Proportions relatives des acides gras dans les échantillons de beurre

(Analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques)
(Résultats exprimés en % de la surface du chromatogramme)

N° des échantillons	C ₄	C ₆	C ₈	C ₁₀	C ₁₂	C ₁₄	C ₁₆	Groupe des C ₁₈	C _{18:0}	C _{18:1}
<i>Troupeau expérimental</i>										
E ₁	0,8	1,5	2,0	4,7	4,9	14,9	31,3	39,9	11,1	23,8
E ₃	1,0	1,4	1,7	4,2	4,6	15,0	31,3	40,8	11,1	25,3
E ₆	0,6	1,6	1,7	3,9	4,7	15,1	33,0	39,4	10,0	25,1
E ₇	0,7	1,5	1,5	3,6	3,8	14,2	32,0	42,7	7,9	28,4
E ₉	0,7	1,7	1,9	4,3	4,4	14,6	29,7	42,7	7,9	30,8
<i>Troupeau témoin</i>										
T ₁	0,9	1,5	1,4	3,8	4,2	13,7	31,8	42,7	11,4	27,0
T ₃	1,4	1,3	1,9	4,3	5,0	14,3	29,8	42,0	10,1	26,9
T ₆	0,6	1,6	1,8	3,4	3,8	11,6	31,2	46,0	8,8	31,9
T ₇	0,7	1,5	1,7	3,8	4,0	12,6	27,3	48,4	8,0	31,7
T ₉	1,0	1,7	1,4	3,0	3,4	12,5	27,9	49,1	8,3	34,0

Proportions relatives des acides gras. — Ces proportions ont été déterminées dans cinq échantillons expérimentaux et cinq échantillons témoins correspondants. La différence constatée au niveau de l'indice d'iode se retrouve au niveau des proportions relatives des acides gras : proportion plus élevée d'acides saturés (acides myristique et palmitique) dans le groupe expérimental que dans le groupe témoin (tabl. 38).

Au cours de l'expérience on note cependant une légère augmentation du taux d'acide oléique qui s'accompagne d'une diminution du taux d'acide stéarique et également du taux d'acide palmitique. Mais ceci est relevé aussi bien pour le groupe témoin que pour le groupe expérimental.

Acides polyinsaturés (tabl. 39). — On ne relève aucune différence entre le troupeau expérimental et le troupeau témoin en ce qui concerne les taux des différents acides polyinsaturés.

TABLEAU 39

Expérience « Suif »

Acides polyinsaturés des échantillons de beurre des troupeaux témoin et expérimentaux

Date des prélèvements (1962)	N° des échantillon	Conjugués			Non conjugués		
		Diènes	Triènes	Tétraènes	Diènes	Triènes	Tétraènes
13-7	1	0,86	0,014	0,001	2,28	0,36	0,21
16-7	2	0,85	0,013	0,001	2,21	0,41	0,22
18-7	3	1,09	0,012	0,001	2,24	0,42	0,21
20-7	4	0,95	0,010	0,001	1,98	0,37	0,19
23-7	5	0,85	0,010	0,001	1,71	0,39	0,19
25-7	6	1,02	0,009	0,001	1,73	0,35	0,20
27-7	7	0,98	0,009	0,001	2,03	0,40	0,19
30-7	8	1,01	0,008	0,001	1,87	0,40	0,20
1-8	9	0,99	0,010	0,001	1,97	0,37	0,20
3-8	10	0,87	0,009	0,001	2,37	0,37	0,26
Moyenne		0,90	0,010	0,001	2,03	0,39	0,20

TABLEAU 39 (*suite*)

Date des prélèvements (1962)	N° des échantillons	Conjugués			Non conjugués		
			Triènes	Tétraènes	Diènes	Triènes	Tétraènes
13-7	1	0,92	0,012	0,001	2,23	0,46	0,26
16-7	2	0,89	0,011	0,001	2,19	0,36	0,23
18-7	3	0,98	0,010	0,001	2,22	0,39	0,25
20-7	4	0,99	0,010	0,000	2,02	0,36	0,27
23-7	5	1,01	0,010	0,001	1,89	0,36	0,21
25-7	6	1,03	0,010	0,001	2,10	0,38	0,20
27-7	7	0,97	0,009	0,001	2,10	0,40	0,19
30-7	8	1,01	0,008	0,008	2,21	0,41	0,20
1-8	9	1,03	0,010	0,001	2,23	0,40	0,21
3-8	10	1,00	0,010	0,001	2,03	0,42	0,20
Moyenne		0,98	0,010	0,001	2,11	0,40	0,22

La différence la plus importante se place au niveau du taux de diène conjugué. Elle est de 0,1 en faveur du troupeau témoin. On note la proportion relativement élevée de l'acide linoléique (diène non conjugué). Dans l'ensemble on peut affirmer qu'il n'y a pratiquement pas eu de modifications au niveau des acides polyinsaturés du fait de la distribution du suif.

IV. — Discussion

A. — CONSOMMATION ET PRODUCTION D'ACIDES GRAS

Il semble ressortir de cette étude qu'une augmentation de la proportion de graisse dans la ration peut parfois entraîner une augmentation du taux butyreux ou de la production de graisse. Cependant compte tenu de la très forte augmentation de lipides dans la ration les variations observées sont faibles, et à peine visibles sur les laits de grands mélanges (par exemple à Myon où la différence du taux butyreux serait seulement 0,8 g/l en faveur du troupeau expérimental). Nous avons vu dans le chapitre II de cette seconde partie que la production de matière grasse du lait n'est pas liée à la consommation de matière grasse mais il se peut cependant que dans le cas de la très forte consommation de lipides provenant de l'herbe lors de la sortie au pâturage, une faible répercussion se fasse sentir au niveau de la production de matière grasse ; nous rapprochons cette observation du fait constaté par DEMARQUILLY et JOURNET (18) en 1959 dans les quelques semaines qui suivent la mise à l'herbe des vaches laitières, au cours desquelles le taux butyreux et la production de matière grasse augmentent légèrement. Jusqu'à maintenant aucune explication de ce phénomène n'avait été donnée.

B. — RÉPERCUSSION AU NIVEAU DU BEURRE

On admet généralement que la composition de la graisse du lait reflète celle de la fraction lipidique ingérée. En effet dans le cas de la distribution d'huile de lin par exemple, à des vaches laitières, le beurre est plus mou et l'indice d'iode s'élève, mais ceci est la conséquence d'une augmentation d'acide oléique. Or la proportion de cet acide dans l'huile de lin est minime. Par contre les fortes quantités d'acides linoléique et linolénique absorbées avec l'huile de lin n'apparaissent pas ou très peu (pour l'acide linolénique) dans la graisse du beurre. C'est pourquoi, si on considère la composition des acides gras polyinsaturés on peut affirmer que la graisse du lait des ruminants est, en fait, peu influencée par les facteurs extérieurs (par la nature de la graisse ingérée par exemple). Comme le rappelle SHORLAND (92) (1963), ceci est la conséquence de l'existence de phénomènes biochimiques très importants (hydrolyse, hydrogénation, synthèse microbienne) qui se déroulent au niveau du rumen. Si on élimine l'action du rumen, il est facile de modifier nettement le taux des acides polyinsaturés dans le lait (SMITH et *al.* (100), 1963).

Une conséquence très importante du point de vue nutritionnel est la grande difficulté, pour ne pas dire l'impossibilité, devant laquelle on se trouve placé d'augmenter par une modification au niveau de la ration, par exemple, le taux

des acides polyinsaturés de la graisse du lait, donc du beurre. Or parmi ces derniers se trouvent les acides essentiels et parmi eux les acides linoléique et arachidonique récemment qualifiés d'« acides indispensables » (LE BRETON et FERRER (64), 1959). D'aucuns souhaiteraient que la graisse du lait de vache contienne davantage d'acide linoléique en particulier lorsque ce lait est destiné à l'alimentation des très jeunes enfants. Ceci est tout à fait justifié, le lait de femme contenant comme nous le savons une proportion d'acide linoléique de l'ordre de 5 à 7 p. 100 des acides totaux donc nettement supérieure à la proportion de ce même acide dans le lait de vache. Par contre si l'on considère la population d'âge plus avancé, c'est-à-dire au-dessus de 4 ou 6 mois, le problème est différent. La matière grasse du lait occupe à ce moment une place relativement neutre. Des fractions importantes de matière grasse sont absorbées avec tous les aliments (sous forme non visible) et le plus souvent cette matière grasse, en particulier celle des céréales, est très riche en acide linoléique (FISHER (26), 1960). Il conviendrait cependant de s'assurer aussi que l'acide linoléique dont on parle est toujours identique à lui-même. Récemment SAMBISAVARAO et BROWN (87) (1962) ont montré la complexité de l'acide diène non conjugué du beurre : on trouve à côté de l'acide linoléique, qui constitue d'ailleurs la fraction principale, des isomères géométriques *cis-trans*- et *trans-cis* (pas d'isomère *trans-trans*) et un isomère de position dont les deux doubles liaisons se trouvent espacées par plus d'un groupe méthylène.

C. — ORIGINE ET NATURE DE L'ACIDE DIÈNE CONJUGUÉ FORMÉ DANS LE RUMEN

Au cours d'une expérience *in vitro*, tendant à montrer l'action hydrogénante du contenu du rumen de mouton sur les acides insaturés, SHORLAND et al. (95) (1957) ont relevé la formation d'une grande quantité d'acide diène conjugué lors de l'incubation du contenu du rumen en présence d'acide linoléique. En présence d'acide linoléique, l'acide diène conjugué n'apparaît qu'en très faible proportion. Cependant *in vivo*, nous avons bien mis en évidence et avons en cela confirmé les expériences de MATSSON et al. (73) (1951), que le taux d'acide diène conjugué augmentait lors de l'introduction d'une quantité élevée d'acide linoléique dans la ration et non d'acide linoléique. L'introduction d'huile de soja n'a pas en effet, entraîné d'augmentation du taux d'acide diène conjugué dans la matière grasse du lait. Au cours de l'expérience « Soja », s'appliquant à des animaux soumis par ailleurs à une alimentation hivernale, le maximum d'absorption, dans la zone correspondant à l'absorption des doubles liaisons conjuguées est resté, pendant toute l'expérimentation à 228 m μ , alors qu'au cours de l'expérience « lin », ce maximum s'est déplacé de 228 à 232 m μ en même temps que l'absorption de la graisse augmentait. Une modification de la nature de l'acide diène conjugué existe donc. S'agit-il d'une augmentation d'acide diène conjugué *cis-trans*? Il faudrait pour le prouver, isoler l'acide diène conjugué du beurre, ce qui jusqu'à maintenant n'a pas été réalisé absolument ; en effet SCOTT et al. (88) (1961) ont seulement obtenu une fraction enrichie en cet acide et MAGIDMAN et al. (69) (1962) ont séparé l'acide diène conjugué par chromatographie en phase gazeuse mais sans le recueillir.

Au moyen de la chromatographie préparative il doit être possible de recueillir

les acides $C_{18} : 2$ en bloc. L'acide diène conjugué pourrait sans doute être ensuite séparé des isomères non conjugués par chromatographie sur couche mince avec support à l'urée. Enfin l'étude du spectre infrarouge de cet acide permettrait d'évaluer la proportion des différents isomères géométriques.

L'étude de la structure de l'acide diène conjugué du beurre et la mise en évidence d'isomères de position revêtent une grande importance aussi bien sur le plan fondamental que sur le plan pratique, cet acide constituant finalement pendant toute la période de grande production laitière (période de pâturage) l'acide polyinsaturé pondéralement le plus important dans le beurre. Les travaux de CLÉMENT et MAY (16) (1953), et de MAY et DEVAUX St. CYR (74) (1954) ont montré que les acides conjugués étaient chez le mammifère (Rat) résorbés, et introduits dans les lipides des réserves et des tissus.

D. — ORIGINE DES ACIDES POLYINSATURÉS DU LAIT

On reste étonné du taux non seulement faible mais très constant des acides polyinsaturés de la graisse du lait de vache, malgré des variations très importantes dans la constitution des graisses ingérées, comme nous venons de le montrer en incorporant au régime des quantités importantes d'acides gras de nature différente.

Il existe donc un système régulateur au niveau de la glande mammaire qui se manifeste par une « captation sélective » des acides gras du sérum sanguin, commandant par un système de compensation la partie biosynthétisée par la glande elle-même.

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE QUANTITATIVE DES ACIDES GRAS INGRÉRÉS ET DES ACIDES GRAS PRÉSENTS DANS LE LAIT

I. — Introduction

Il n'existe pas de relation simple entre les acides gras ingérés par la vache laitière et les acides gras sécrétés dans le lait puisque des modifications que l'on connaît d'ailleurs imparfaitement, atteignent les acides gras résorbés, au niveau du rumen.

Par ailleurs le lait sécrété par la glande, représente, en partie des acides gras circulants, fonction des acides gras résorbés, et en partie des acides gras synthétisés *in situ*, par l'épithélium mammaire.

Cependant la comparaison entre les acides gras ingérés, d'une part, et les acides gras présents dans le lait, d'autre part, nous semble intéressante. Cette comparaison devrait permettre de regrouper les acides gras du lait en fonction d'une origine commune de nature exogène ou biosynthétique.

Une telle étude comportant la détermination quantitative et qualitative des acides gras contenus dans les aliments ingérés et dans le lait produit, pendant une période de temps définie; n'a pas été tentée antérieurement ; c'est pourquoi nous ne nous référons à aucune étude similaire.

II. — Matériel et méthodes

Une telle expérience a pu être entreprise grâce à la collaboration de la Station de Recherches sur l'Élevage au Centre National de Recherches Zootechniques à Jouy-en-Josas. En effet cette Station dispose de troupeaux sur lesquels portent continuellement des expériences d'alimentation. Un contrôle strict des aliments consommés et du lait produit y est assuré.

Nous avons ainsi surajouté notre propre expérience à une expérience d'alimentation en cours à la Station de Recherches sur l'Élevage.

A. — TROUPEAU EXPÉRIMENTAL—PRÉLÈVEMENTS

Deux troupeaux expérimentaux de 8 vaches étaient soumis à une même alimentation de base composée de foin, d'ensilage, de betteraves et de concentré. La seule différence dans l'alimentation des animaux appartenant à chaque troupeau était la distribution du foin sous forme normale ou sous forme agglomérée (pellets). Les quantités d'aliments distribués et refusés étaient soigneusement pesées.

Nous avons choisi deux vaches de chaque troupeau expérimental : 103 H et 158 H, 9 019 H et 9 028 H.

Pendant 5 jours consécutifs nous avons prélevé pour chacune des vaches à la traite du soir et à la traite du matin trois litres de lait, quantité suffisante pour préparer par écrémage du lait puis barattage de la crème, un échantillon de beurre destiné à l'analyse.

Trois semaines plus tard les régimes alimentaires ont été inversés entre les deux troupeaux, et nous avons à nouveau prélevé le lait des animaux retenus, mais seulement pendant 2 jours, espacés, d'une journée. Nous avons ainsi préparé 40 échantillons de beurre correspondant à la première partie de l'expérience et 16 échantillons correspondant à la seconde partie de l'expérience.

Nous avons noté les quantités des différents aliments consommés par les vaches laitières et nous avons prélevé des échantillons de ces aliments en vue de l'analyse des fractions lipidiques.

B. — ANALYSE

a) *Analyse des aliments*

On a déterminé l'extrait sec et le taux des lipides. Les lipides ont été extraits à l'éther de pétrole additionné de 10 p. 100 d'alcool éthylique. Après saponification de la matière grasse, extraction de l'insaponifiable et acidification de la solution, les acides gras étaient extraits, pesés et estérifiés (esters méthyliques).

Les proportions relatives des différents acides gras étaient déterminées par chromatographie en phase gazeuse. (Conditions de l'analyse : appareil Aerograph, modèle 110 C (Wilkens Walnut, Californie) ; colonne longueur 3 m, diamètre 0,63 cm, chargée à 15 % de polyester de Craig sur brique 60-80 mesh ; température 210° C environ ; gaz vecteur : hélium ; débit 50 ml/mn environ).

Ce protocole d'analyse a été appliqué aux différents aliments. La betterave et l'ensilage ont été découpés en fines parcelles, lyophilisés puis broyés avant d'être soumis à l'extraction.

b) *Analyse du lait et des échantillons de beurre*

Les quantités de lait produites à chaque traite et les quantités totales journalières ont été notées et le taux butyreux journalier déterminé. On a analysé séparément les échantillons de beurre correspondant aux prélèvements du matin et ceux correspondant aux prélèvements du soir.

Sur la matière grasse obtenue après fusion et centrifugation du beurre on a déterminé le taux d'acides gras conjugués. On a préparé les esters méthyliques par transestérification et les proportions relatives des différents acides gras ont été calculées à partir de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, effectuée dans des conditions voisines de celles indiquées pour l'analyse des aliments.

III. — Résultats

A. — ANALYSE DES ALIMENTS

On a porté dans le tableau 40 les résultats de l'analyse des aliments. Le taux d'acides gras en pour cent d'extrait sec nous intéresse particulièrement.

Dans le tableau 41 on a rassemblé les résultats de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides gras contenus dans les différents aliments.

TABEAU 40

Résultats des analyses des aliments
(Concentrés-foin-ensilage-betterave)

Nature de l'aliment	Extrait sec		Poids mis pour l'extraction (g)	Poids en extrait sec	Lipides totaux en g	Lipides totaux % E. S.
	% de produit frais	% du produit lyophilisé				
Concentré (Production) n° 1 ...	86,6		80	69,3	2,3192	3,4
Concentré (Base) n° 2.....	88,0		80	70,4	1,9419	2,8
Foin	88,5		40	35,4	1,2832	3,6
Ensilage.....	28,7	89,5	60	53,7	4,2645	7,9
Betteraves	16,1	89,9	80	71,9	0,5801	0,81

Nature de l'aliment	Insaponifiable			Acides gras		
	Poids en g	% Extrait sec	% de lipides totaux	Poids en g	% Extrait sec	% de lipides totaux
Concentré (Production) n° 1...	0,1162	0,17	5,01	1,6612	2,39	71,63
Concentré (Base) n°2.....	0,0683	0,10	3,52	1,3386	1,90	68,93
Foin	0,2538	0,72	19,78	0,4978	1,41	38,79
Ensilage.....	0,4881	0,91	11,46	0,979	1,82	22,96
Betteraves	0,0875	0,12	15,08	0,2237	0,31	38,56

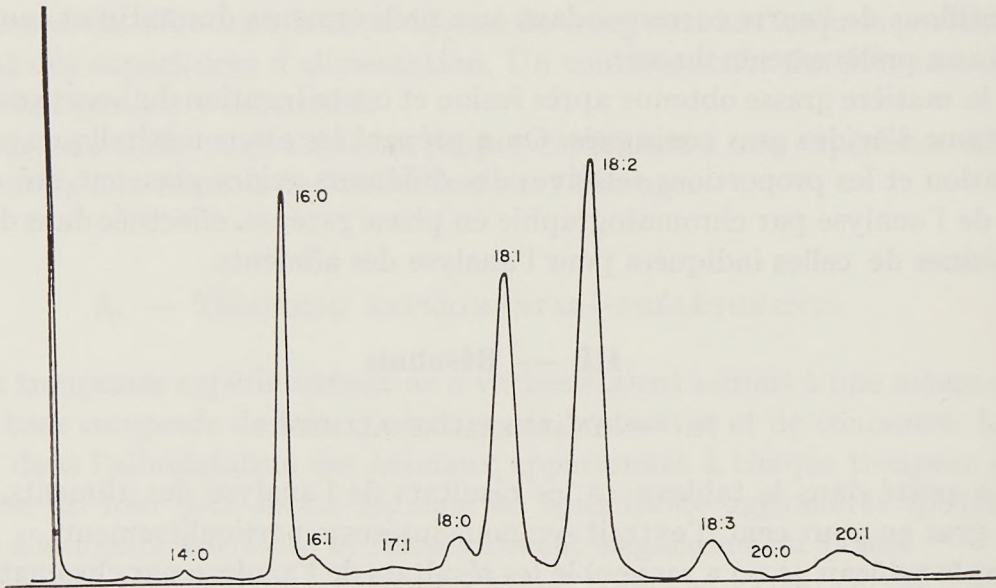


FIG. 34. — Esters méthyliques des acides gras du concentré

L'observation de ces résultats conduit aux remarques suivantes :

Le concentré céréales est relativement riche en huile ; huile elle-même très riche en acide linoléique (figure 34).

Il existe un nombre important d'acides gras dans les lipides de l'ensilage où on décèle presque autant d'acides que dans le beurre (figure 35). Nous sommes loin de la relative simplicité des huiles de tourteaux étudiées dans le chapitre III (2^e partie).

Nous notons en particulier la présence en quantités notables, dans les lipides de l'ensilage, des acides à bas poids moléculaire, des acides à nombre impair d'atomes de carbone, des acides à chaîne ramifiée. Ces acides n'apparaissent qu'à l'état de traces dans le foin (figure 36).

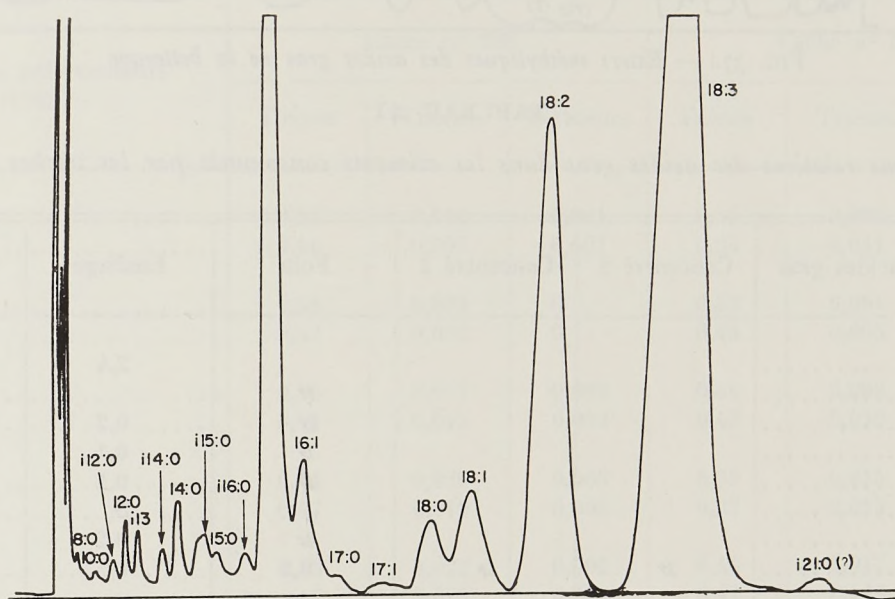


FIG. 35. — Esters méthyliques des acides gras de l'ensilage

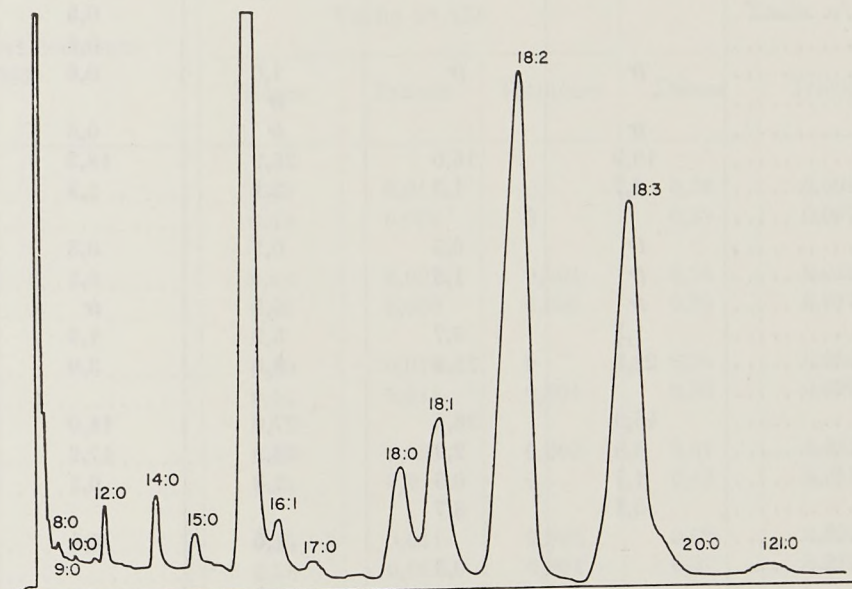


FIG. 36. — Esters méthyliques des acides gras du foin

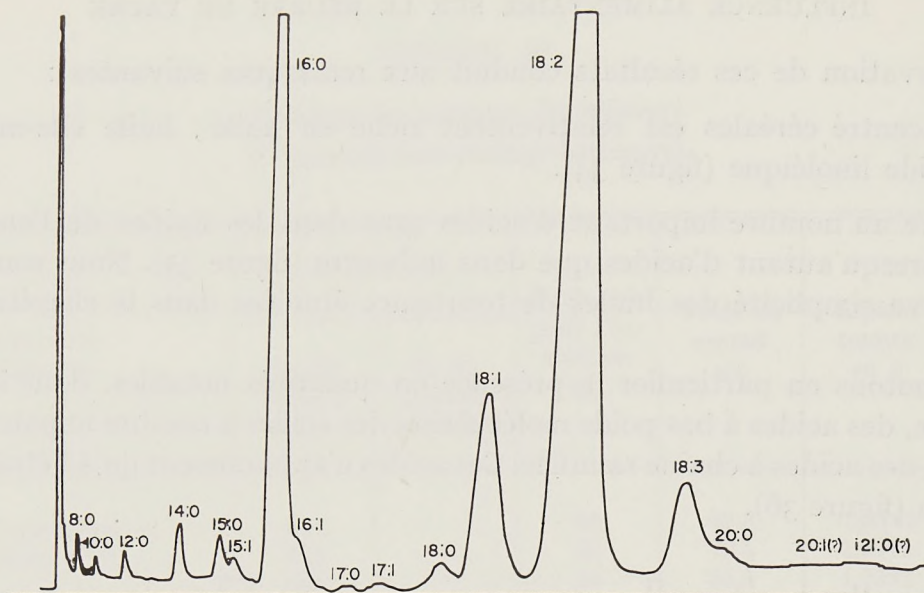


FIG. 37. — Esters méthyliques des acides gras de la betterave

TABLEAU 4I

Proportions relatives des acides gras dans les aliments consommés par les vaches laitières

Nature des acides gras	Concentré 1	Concentré 2	Foin	Ensilage	Betterave
4:0				2,4	
6:0			<i>tr</i>		
8:0			<i>tr</i>	0,2	0,4
9:0			<i>tr</i>	0,1	0,4
10:0			<i>tr</i>	0,1	0,4
11:0				<i>tr</i>	
i12:0			<i>tr</i>	0,2	
12:0	<i>tr</i>	<i>tr</i>	0,5	0,5	0,6
12:1					
i13:0				0,6	
13:0			<i>tr</i>	<i>tr</i>	
14:0				0,4	
i14:0	<i>tr</i>	0,3	2,1	1,1	1,2
14:1				0,5	
15:0				0,6	
15:1	<i>tr</i>	<i>tr</i>	1,0	0,6	1,2
i16:0	<i>tr</i>		<i>tr</i>		0,6
16:0	19,9	16,0	26,9	18,3	25,0
16:1	0,7	1,5	2,1	2,8	1,0
i17:0					
17:0	<i>tr</i>	0,5	0,9	0,3	0,2
17:1	<i>tr</i>	1,3		0,1	0,5
i18:0	<i>tr</i>		0,2	<i>tr</i>	
18:0	1,3	3,7	5,3	1,9	1,1
18:1	22,5	25,8	8,0	3,0	8,7
19:0					
18:2	46,9	38,6	27,0	18,0	51,7
18:3	3,9	2,9	23,8	47,2	5,8
20:0	1,7	0,3	1,2	0,1	1,5
20:1	3,1	3,7			<i>tr</i>
i21:0			1,0	0,4	0,1
22:0		0,3			
22:1		5,1			

Nous notons également la différence au niveau des acides majeurs, entre l'ensilage, très riche en acide linoléique, et le foin, très riche en acide linoléique.

Nous relevons la présence en proportion très notable de l'acide insaturé en C₁₅, dans les acides gras de la betterave (Figure 37). HERB et *al.* (43) (1962) ont récemment signalé l'existence de cet acide dans le beurre.

Tous les aliments analysés contiennent une proportion importante d'acide palmitique qui ne s'accompagne que d'une très faible quantité d'acide myristique à l'inverse de ce que l'on trouve toujours dans le beurre.

TABLEAU 42

Taux des acides polyinsaturés conjugués dans les échantillons de beurre

Date des prélèvements (1963)	Vache n° 103			Vache n° 9028		
	Diènes	Triènes	Tétraènes	Diènes	Triènes	Tétraènes
18-2 soir	0,52	0,010	0,001	0,44	0,008	0,001
19-2 matin	0,46	0,009	0,001	0,34	0,011	0
20-2 soir	0,48	0,009	0	0,53	0,004	0
21-2 matin	0,42	0,009	0	0,45	0,005	0
22-2 soir	0,46	0,017	0,002	0,56	0,009	0,001
23-2 matin	0,41	0,015	0,002	0,43	0,010	0,001
25-3 soir	0,51	0,020	0,003	0,39	0,015	0,002
26-3 matin	0,47	0,019	0,003	0,37	0,013	0,002
28-3 soir	0,53	0,022	0,002	0,44	0,017	0,002
29-3 matin	0,47	0,022	0,002	0,41	0,016	0,001

Date des prélèvements (1963)	Vache n° 158			Vache n° 9019		
	Diènes	Triènes	Tétraènes	Diènes	Triènes	Tétraènes
18-2 soir	0,49	0,011	0	0,38	0,009	0
19-2 matin	0,49	0,008	0	0,39	0,007	0
20-2 soir	0,42	0,022	0,001	0,34	0,010	0,001
21-2 matin	0,41	0,020	0,001	0,34	0,011	0,001
22-2 soir	0,50	0,018	0	0,34	0,014	0,002
23-2 matin	0,44	0,018	0,001	0,30	0,009	0,001
25-3 soir	0,52	0,015	0,003	0,41	0,012	0,003
26-3 matin	0,54	0,014	0	0,43	0,011	0,001
28-3 soir	0,54	0,011	0,002	0,39	0,013	0,003
29-3 matin	0,48	0,012	0,001	0,37	0,012	0,002

Connaissant les quantités des différents aliments consommés par chacune des vaches laitières, le taux d'acides gras et les proportions relatives des acides gras, il est possible de calculer les quantités d'acides gras totaux absorbées chaque jour avec chaque aliment par les vaches laitières, et également les quantités de chacun des acides gras.

B. — ANALYSE DES ÉCHANTILLONS DE BEURRE

Le taux des acides conjugués a été déterminé sur tous les échantillons de beurre. Les résultats sont portés dans le tableau 42.

On note généralement, et ceci confirme une fois de plus ce que nous avons déjà noté dans des travaux antérieurs, un taux un peu plus élevé de diènes conjugués le soir que le matin.

TABLEAU 43

Proportions relatives des acides gras des échantillons de beurre (série 1)

Nature des acides	103		9028		158	
	Soir	Matin	Soir	Matin	Soir	Mat'n
4 : 0	0,5	1,0	1,4	2,0	1,8	0,8
6 : 0	1,7	2,1	2,0	3,0	1,6	1,8
8 : 0	1,6	2,1	1,9	2,8	1,8	1,7
9 : 0			0,1	0,1	0,1	0,1
10 : 0	4,9	4,8	5,2	5,2	4,6	5,0
10 : 1	0,6	0,4	0,6	0,6	0,4	0,5
i 11 : 0			—	—	—	—
11 : 0			0,2	0,1	0,2	0,2
12 : 0	5,3	5,6	5,5	6,1	5,5	5,9
12 : 1	0,4	0,3	0,2	0,2	0,3	0,4
i 13 : 0			0,2	0,2		
13 : 0	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2
i 14 : 0	0,4	0,1	0,3	0,1	0,3	0,3
14 : 0	14,2	15,0	13,4	13,2	15,3	14,7
14 : 1	2,4	2,3	1,8	2,2	2,4	2,6
i 15 : 0						
15 : 0	2,1	1,8	1,8	1,6	2,1	2,2
15 : 1				0,1		
i 16 : 0	0,6	0,5	0,4	0,2	0,6	0,5
16 : 0	31,1	31,1	29,8	29,4	37,4	35,7
16 : 1	2,0	2,7	2,6	2,5	2,1	2,0
i 17 : 0	1,2	1,1	0,8	0,8	1,0	1,0
17 : 0	1,2	1,4	1,3	0,8	1,2	1,3
17 : 1	0,7	1,1	0,7	0,5	1,0	0,8
i 18 : 0						
18 : 0	8,4	8,4	7,9	8,6	5,3	6,3
18 : 1	16,9	14,7	16,9	16,2	11,7	12,3
18 : 2	2,2	1,9	2,9	2,1	1,9	2,0
19 : 0	0,1	0,2	0,1	0,2	0,2	0,2
18 : 3	0,7	0,6	0,8	0,5	0,5	0,9
i 20 : 0	0,4	0,4	0,6	0,4	0,2	0,4
20 : 0	0,2	0,3	0,4	0,2	0,2	0,2

Les taux trouvés montrent que le beurre présente les caractéristiques d'un beurre d'hiver. Connaissant la corrélation étroite qui existe entre le taux de diènes conjugués et l'indice d'iode on peut affirmer que l'indice d'iode de tous les échantillons de beurre est inférieur à 30.

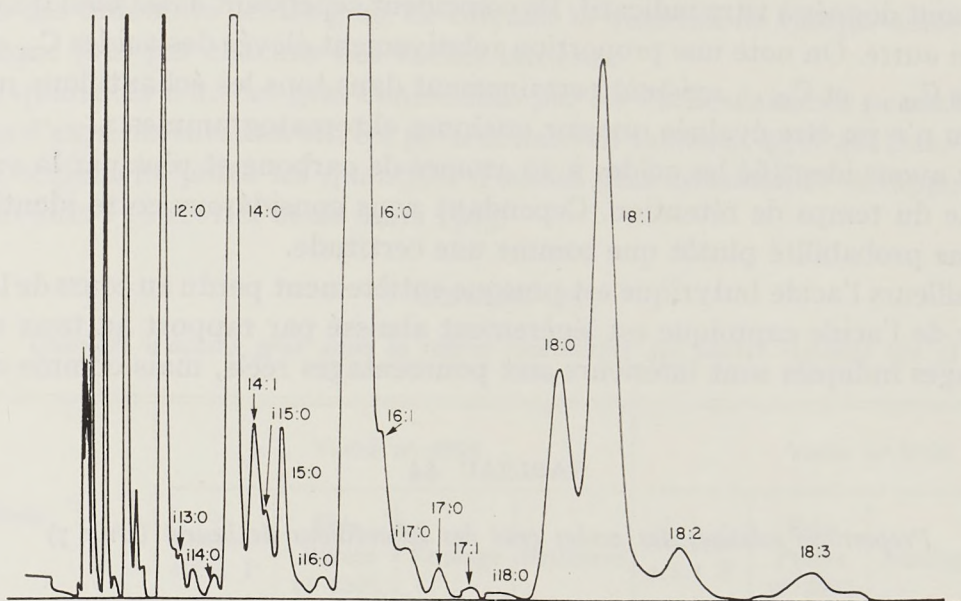


FIG. 38. — Séparation par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques des acides gras du beurre. Les pics correspondant aux acides ramifiés sont nettement visibles.

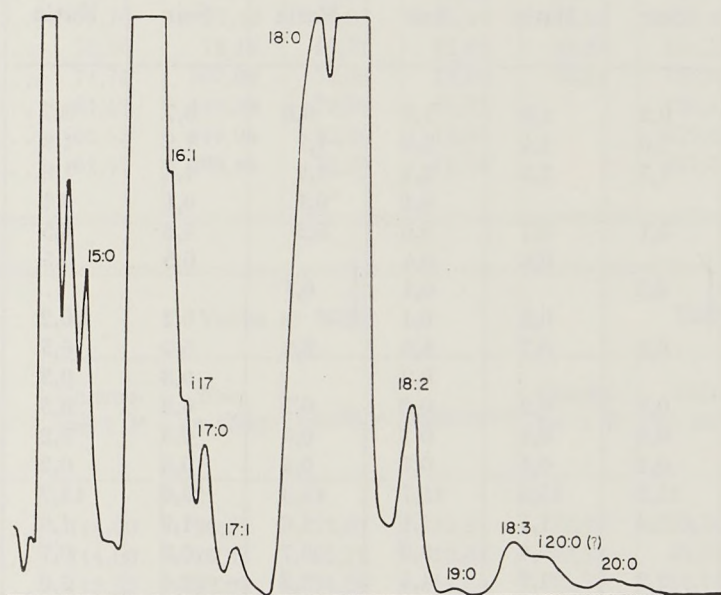


FIG. 39. — Chromatogramme des esters méthyliques des acides gras supérieurs du beurre.

Les résultats de l'analyse par chromatographie en phase gazeuse des acides gras des échantillons de beurre appartenant aux séries 1 et 7, sont présentés dans les tableaux 43 et 44 et sur les figures 38 et 39. On note quelques différences mineures entre le soir et le matin et également quelques différences tout aussi faibles entre les échantillons correspondant à différentes vaches.

Nous remarquons la très forte proportion d'acide palmitique trouvée dans tous les cas. Celle-ci s'accompagne d'une très faible proportion d'acide oléique. Nous

avons déjà rencontré de telles proportions dans des échantillons de beurre du mois de mars fabriqués à partir du lait produit par les vaches du troupeau du Centre national de Recherches zootechniques.

Nous avons présenté des pourcentages d'acides inférieurs à 1 p. 100. Ces pourcentages sont donnés à titre indicatif. Ils coïncident cependant assez bien d'un échantillon à un autre. On note une proportion relativement élevée des acides C_{14} et $C_{16} : 1$. Les acides $C_{15} : 1$ et $C_{12} : 1$ existent certainement dans tous les échantillons mais leur proportion n'a pu être évaluée que sur quelques chromatogrammes.

Nous avons identifié les acides à 20 atomes de carbone et plus par la valeur du logarithme du temps de rétention. Cependant nous considérons cette identification comme une probabilité plutôt que comme une certitude.

Par ailleurs l'acide butyrique est presque entièrement perdu au cours de l'analyse et le taux de l'acide caproïque est légèrement abaissé par rapport au taux réel. Les pourcentages indiqués sont inférieurs aux pourcentages réels, mais comme ces deux

TABLEAU 44

Proportions relatives des acides gras des échantillons de beurre (série 7)

Nature des acides	103		9028		158		9019	
	Soir	Matin	Soir	Matin	Soir	Matin	Soir	Matin
4 : 0.....	0,3	1,0	1,1	0,5	0,7	0,7	1,3	2,0
6 : 0.....	2,0	2,4	2,9	1,9	1,9	1,9	2,5	3,0
8 : 0.....	1,7	2,2	2,4	1,9	1,8	1,8	1,8	2,0
9 : 0.....			0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
10 : 0.....	5,1	5,7	5,5	5,2	4,2	4,5	4,1	4,9
10 : 1.....		0,4	0,4		0,5	0,5	0,7	0,6
i11 : 0.....	0,7		0,1	0,7				
11 : 0.....		0,1	0,1		0,2	0,2	0,2	0,2
12 : 0.....	6,2	6,7	6,6	6,2	6,2	6,5	5,1	6,2
12 : 1.....			0,2		0,3	0,3	0,3	0,3
i13 : 0.....	0,3	0,2	0,2	0,7	0,3	0,3	0,2	0,3
13 : 0.....	0,2	0,1	0,2	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2
i14 : 0.....	0,2	0,1	0,1	0,3	0,3	0,2	0,3	0,2
14 : 0.....	15,3	15,5	15,7	14,3	13,6	13,7	13,2	13,1
14 : 1.....	2,3	1,4	1,1	1,6	1,9	1,9	2,2	2,0
i15 : 0.....		0,4	0,6	0,7	0,8	0,7	0,7	0,4
15 : 0.....	2,2	1,7	1,4	2,3	2,4	2,0	1,7	1,4
15 : 1.....			0,2					
i16 : 0.....	0,4	0,4	0,4	0,6	0,5	0,4	0,4	0,2
16 : 0.....	38,3	36,1	37,2	35,9	33,0	37,1	39,6	36,6
16 : 1.....	2,6	2,2	2,3	2,9	2,5	1,9	2,5	1,7
i17 : 0.....	1,0	0,8	1,2	1,5	1,3	1,2	1,3	1,1
17 : 0.....	1,0	0,9	0,9	1,2	0,9	0,6	0,9	1,0
17 : 1.....	0,3	0,3	0,7	0,4	0,5	0,5	0,9	1,7
i18 : 0.....	0,1	0,1	0,2	0,8	0,3	0,3	0,2	0,3
18 : 0.....	5,7	6,4	5,1	6,0	6,4	7,1	5,2	6,6
18 : 1.....	11,8	11,7	11,0	11,5	16,0	13,1	12,7	12,3
18 : 2.....	1,5	2,1	1,6	2,0	2,2	1,7	1,4	2,2
18 : 3.....	0,8	1,1	0,5	0,4	0,9	0,6	0,2	0,4

acides représentent à peine 5 p. 100 des acides totaux, l'erreur commise dans l'évaluation du taux de ces acides ne modifie pas le sens des résultats.

On connaît les quantités de matière grasse de lait produites par jour. Si on évalue à 90 p. 100 le taux des acides gras totaux, il est possible, connaissant les proportions relatives des différents acides gras, de calculer la quantité de chaque acide gras produit chaque jour par chacune des vaches laitières.

Les quantités d'acides gras consommés par les vaches laitières pendant les deux semaines d'expérimentation ont été portées dans les tableaux 45 et 46. Dans le tableau 47 on a seulement porté les quantités d'acides gras consommés se rapportant aux jours suivants : 18 février et 28 mars 1963.

TABLEAU 45

Quantité d'acides gras dans la ration journalière des vaches laitières (en g)

Date	Vache n° 9019				Vache n° 0158			
	Concentré 1 P	Foin Pellets n° 2502	Ensilage	Betterave	Concentré 1 P	Foin Pellets n° 2502	Ensilage	Betterave
Vendredi 15-2-63	72,18	151,86	63,52	12,21	20,55	210,80	57,51	9,18
Samedi 16-2-63	72,18	105,47	78,81	12,03	20,55	149,32	61,33	9,02
Lundi 18-2-63	71,70	77,13	67,34	11,84	10,28	198,95	60,79	8,90
Mardi 19-2-63	71,70	72,19	69,71	11,84	10,28	154,25	78,82	8,90
Mercredi 20-2-63	71,70	107,02	73,53	11,84	10,28	194,02	72,62	8,90
Jeudi 21-2-63	61,42	112,38	79,90	11,72		184,43	74,44	8,80
Vendredi 22-2-63	61,42	116,04	82,26	11,84		173,43	88,45	8,90
Samedi 23-2-63	61,42	109,84	72,25	11,78		207,55	77,90	8,84

Date	Vache n° 9028				Vache n° 0103			
	Concentré 1 P	Foin n° 2502	Ensilage	Betterave	Concentré 1 P	Foin n° 2502	Ensilage	Betterave
Vendredi 15-2-63	114,00	29,33	72,07	12,21	72,18	29,33	64,79	9,18
Samedi 16-2-63	114,00	26,93	85,72	12,03	72,18	24,53	88,82	9,02
Lundi 18-2-63	113,53	32,29	74,26	11,84	71,70	11,14	76,44	8,90
Mardi 19-2-63	113,53	36,10	78,62	11,84	71,70	16,22	89,91	8,90
Mercredi 20-2-63	113,53	36,10	82,99	11,84	71,70	13,77	91,73	8,90
Jeudi 21-2-63	112,81	23,55	80,99	11,72	81,98	22,28	97,01	8,80
Vendredi 22-2-63	112,81	23,55	85,72	11,84	81,98	8,74	92,46	8,90
Samedi 23-2-63	112,81	23,55	73,53	11,78	81,98	3,67	81,54	8,84

Utilisant ensuite les résultats portés dans le tableau 41, on a pu déterminer la consommation au niveau de chaque acide gras. Ces quantités, correspondant au 18 février (série 1) et au 28 mars (série 7) sont portées dans les tableaux 48 et 49 sous l'indication « Consommation ».

TABLEAU 46

Quantité d'acides gras (en g) dans la ration journalière des vaches laitières (Période de mars 1963)

Date	Vache n° 9028				Vache n° 0103			
	Concentré 1 P	Foin Pellets n° 2502	Ensilage	Betterave	Concentré 1 P	Foin Pellets n° 2502	Ensilage	Betterave
Lundi 25-3-63	10,5	121,8	88,5	12,3	—	131,8	86,6	9,2
Mardi 26-3-63	10,5	62,2	94,6	11,2	—	110,7	94,6	8,4
Mercredi 27-3-63	10,5	149,2	98,3	11,8	—	116,9	88,6	8,8
Jeudi 28-3-63	31,3	120,0	94,6	11,2	—	116,2	87,4	8,4
Vendredi 29-3-63	31,3	121,1	89,9	11,7	—	137,5	69,5	8,8
Samedi 30-3-63	31,3	155,0	74,3	11,9	—	143,7	82,8	8,9

Date	Vache n° 9019				Vache n° 0103			
	Concentré 1 P	Foin n° 2502	Ensilage	Betterave	Concentré 1 P	Foin n° 2502	Ensilage	Betterave
Lundi 25-3-63	80,7	20,9	113,3	12,3	52,1	45,1	98,8	9,2
Mardi 26-3-63	83,7	6,7	116,8	11,2	52,1	31,6	92,1	8,4
Mercredi 27-3-63	83,7	11,6	113,8	11,8	52,1	34,0	100,7	8,8
Jeudi 28-3-63	83,7	13,5	112,1	11,2	41,8	20,1	104,8	8,4
Vendredi 29-3-63	83,7	3,7	107,0	11,7	41,8	24,5	92,1	8,8
Samedi 30-3-63	83,7	12,3	109,8	11,9	41,8	35,5	103,6	8,9

TABLEAU 47

Quantités d'acides gras consommés par les vaches laitières (en g)

Date	Vache n° 103				
	Concentré	Foin	Ensilage	Betterave	Total
18-2-63 (Série 1).....	71,7	11,1	76,4	8,9	168,1
28-3-63 (Série 7).....	0	116,2	87,4	8,4	212,0
	Vache n° 9028				
	Concentré	Foin	Ensilage	Betterave	Total
18-2-63 (Série 1).....	113,5	32,3	74,3	11,8	231,9
28-3-63 (Série 7).....	31,3	120,0	94,6	11,2	257,1
	Vache n° 158				
	Concentré	Foin	Ensilage	Betterave	Total
18-2-63 (Série 1).....	10,3	199,0	60,8	8,9	279
28-3-63 (Série 7).....	41,8	20,1	104,8	8,4	175,1
	Vache n° 9019				
	Concentré	Foin	Ensilage	Betterave	Total
18-2-63 (Série 1).....	71,1	77,2	67,3	11,8	227,9
28-3-63 (Série 7).....	83,7	13,5	112,1	11,2	220,5

TABLEAU 48

Étude comparée des acides gras consommés par la vache laitière et des acides gras produits dans le lait
(Série 1)

Nature des acides gras	Vache n° 103		Vache n° 9028		Vache n° 158	
	Acides gras consommés (en g)	Acides gras produits (en g)	Acides gras consommés (en g)	Acides gras produits (en g)	Acides gras consommés (en g)	Acide gras produits (en g)
	168,1	463,3	231,9	709,7	279,0	517,9
4 : 0.....	1,7	3,7	1,7	12,1	1,5	6,7
6 : 0.....		8,8		10,5		8,8
8 : 0.....		8,8		17,0		8,8
9 : 0.....		0,1		0,7		0,5
10 : 0.....	0,1	22,7	0,2	36,8	0,1	24,9
10 : 1.....		2,3		4,3		2,6
i11 : 0.....				1,4		1,0
11 : 0.....						
i12 : 0.....	0,2				0,1	
12 : 0.....	0,6	25,5	0,7	41,2	1,4	29,5
12 : 1.....		1,9		1,4	0,4	2,1
i13 : 0.....	0,5		0,5	1,4		
13 : 0.....				1,4		
i14 : 0.....	0,3		0,3	2,1	0,2	1,6
14 : 0.....	1,1	67,6	1,6	94,5	5,0	77,7
14 : 1.....	0,4	10,7	0,4	14,2	0,3	13,0
15 : 0.....	0,4		0,4		0,4	
15 : 0.....	0,7		0,9		2,5	
15 : 1.....	0,1		0,1		0,1	
i16 : 0.....	0,5	2,3	0,5	2,8	0,4	3,1
16 : 0.....	33,5	144,0	47,7	210,4	68,7	189,4
16 : 1.....	2,9	10,7	3,8	18,5	6,1	10,4
i17 : 0.....		5,1		5,7		5,2
17 : 0.....	0,3	6,0	1,1	8,5	2,0	6,2
17 : 1.....	0,2	4,2	0,2	5,0	0,2	4,7
i18 : 0.....	0,1		0,2		0,4	
18 : 0.....	3,1		4,6		12,0	
18 : 1.....	20,2		31,1		20,8	
18 : 2.....	54,9	9,3	81,1	17,7	74,0	10,4
19 : 0.....		0,9		1,4		1,0
18 : 3.....	41,9	2,8	47,7	5,0	76,9	3,6
i20 : 0.....		1,9		3,4		1,6
20 : 0.....	1,5	0,9	2,6	2,1	2,8	1,0
20 : 1.....	2,2		3,5		0,3	
i21 : 0.....	0,4		0,6		2,2	

On a porté également dans ces tableaux 48 et 49 les quantités des divers acides gras produits dans le lait par les différentes vaches pendant la période choisie

Les résultats montrent qu'il existe une très grande perte au niveau des acides linoléique et linolénique, et un gain très élevé au niveau des acides oléique et stéarique, ce dont nous pouvions nous douter à la suite des précisions apportées dans les chapitres précédents sur la transformation des acides insaturés de la ration.

Un gain également très important existe au niveau des acides saturés de C₄ à C₁₆ qui proviennent principalement, comme nous le savons, de la biosynthèse au niveau de la glande mammaire.

TABLEAU 49

Étude comparée des acides gras consommés par la vache laitière et des acides gras produits dans le lait
(Série 7)

Nature des acides gras	Vache n° 103		Vache n° 9028	
	Acides gras consommés (en g)	Acides gras produits (en g)	Acides gras consommés (en g)	Acides gras produits (en g)
	212,0	386,3	257,1	563,2
4 : 0	2,1	2,3	2,3	4,5
6 : 0		8,5		13,5
8 : 0		7,3		11,8
9 : 0	0,1		0,1	0,6
10 : 0	0,1	20,9	0,3	30,4
10 : 1		1,5		2,3
i 11 : 0				
11 : 0		0,4		1,1
i 12 : 0	0,2			
12 : 0	1,1	24,7	1,2	36,0
12 : 1		1,2		1,7
i 13 : 0	0,5		0,6	1,7
13 : 0				1,7
i 14 : 0	0,4	0,8	0,4	1,1
14 : 0	3,5	59,6	3,6	85,2
14 : 1	0,4	6,6	0,5	7,3
i 15 : 0	0,5	1,5	0,6	3,4
15 : 0	1,8	6,6	1,9	10,7
15 : 1	0,1	1,5	0,1	1,0
i 16 : 0	0,5		0,6	2,2
16 : 0	49,4		58,4	206,4
16 : 1	5,0	10,0	5,5	14,6
i 17 : 0		3,9		7,3
17 : 0	1,4	3,5	1,4	5,6
17 : 1		1,2	0,2	2,8
i 18 : 0		0,4	0,2	2,8
18 : 0	8,0	23,6	8,7	31,5
18 : 1	12,6	45,2	20,4	63,6
18 : 2	51,4	7,0	69,6	10,1
18 : 3	69,5	3,9	75,2	2,3
20 : 0	1,6		2,2	
20 : 1			1,0	
i 21 : 0	1,6		1,6	

En ce qui concerne les acides mineurs, le calcul montre qu'il y a un gain au niveau des acides C₁₄ : 1 et C₁₆ : 1 et d'une façon générale au niveau de tous les acides à nombre impair d'atomes de carbone ou à chaîne ramifiée, particulièrement pour ces derniers au niveau des acides à 15 et 17 atomes de carbone.

Nous n'avons pas l'ambition de présenter les chiffres des tableaux 48 et 49 comme absolument exacts, mais la similitude des résultats obtenus au cours des sept bilans présentés donne à l'ensemble de l'étude une réelle solidité.

TABLEAU 49 (*suite*)

Nature des acides gras	Vache n° 158		Vache n° 9019	
	Acides gras consommés (en g)	Acides gras produits (en g)	Acides gras consommés (en g)	Acides gras produits (en g)
	175,1	495,4	220,5	646,0
4 : 0	2,5	3,5	2,7	10,3
6 : 0		9,4		18,1
8 : 0		8,9		12,3
9 : 0		0,5		0,6
10 : 0		21,8		29,1
10 : 1	0,2	2,5	0,2	3,9
i 11 : 0				
11 : 0		1,0		1,3
i 12 : 0	0,2		0,2	
12 : 0	0,8	31,7	0,9	36,2
12 : 1		1,5		1,9
i 13 : 0	0,6	1,5	0,7	1,9
13 : 0		1,0		1,9
i 14 : 0	0,4	1,5	0,4	1,3
14 : 0	1,7	67,9	1,6	85,3
14 : 1	0,5	9,4	0,6	13,6
i 15 : 0	0,6	4,0	0,7	3,2
15 : 0	0,9	10,9	0,9	10,3
15 : 1	0,1		0,1	1,9
i 16 : 0	0,6	2,0	0,7	
16 : 0	35,0	173,8	43,2	246,2
16 : 1	3,7	10,9	4,0	13,6
i 17 : 0		5,9		7,8
17 : 0	0,5	4,0	0,4	5,8
17 : 1	0,1	2,5	0,2	5,2
i 18 : 0		1,5		1,9
18 : 0	3,7	33,2	4,0	38,1
18 : 1	14,8	71,7	24,3	80,8
18 : 2	48,4	9,4	69,0	11,6
18 : 3	56,4	3,5	60,2	1,9
20 : 0	1,1		1,9	
20 : 1	1,3		2,6	
i 21 : 0 ?	0,6		0,6	

IV. — Discussion

A. — SIMILITUDE DE NATURE ENTRE LES ACIDES GRAS CONSOMMÉS ET LES ACIDES GRAS SÉCRÉTÉS PAR LA GLANDE MAMMAIRE

Dans un chapitre précédent nous avons étudié des huiles végétales dont la composition en acides gras est relativement simple (huile de coprah, de soja, de lin). Nous nous trouvons ici devant des lipides végétaux dont la composition en acides

gras est presque aussi complexe que celle du beurre, et nous pouvons même affirmer que les lipides d'une herbe ensilée sont peut-être encore plus complexes, car nous n'avons dans tous les cas décelé par la technique de chromatographie en phase gazeuse qu'une fraction des acides gras présents.

Nous trouvons très remarquable la présence en quantité notable dans les lipides de la racine de betterave de l'acide insaturé à 15 atomes de carbone (identification probable mais non certaine) décelé récemment, en 1962, dans le beurre, par HERB et al. (43).

Nous ne sommes pas éloignés de croire qu'en perfectionnant encore les techniques analytiques, nous retrouverions dans ces lipides végétaux presque tous les acides gras signalés dans le beurre, comme si une « séquence universelle » existait au niveau des acides gras des êtres vivants.

Il est possible que les huiles de graine soient beaucoup moins complexes que les lipides des tissus parce qu'elles constituent un élément de réserve qui n'évolue plus. Par contre les lipides des tissus végétaux sont constamment renouvelés. Ce renouvellement se fait avec des vitesses différentes selon l'organe et selon la nature du lipide. Les synthèses *de novo* sont actives et importantes. Les acides gras libres en particulier constituent probablement une fraction en continuel renouvellement.

B. — COMPOSITION PARTICULIÈRE DE LA MATIÈRE GRASSE DU LAIT D'HIVER

Lorsqu'on étudie les bilans des « acides gras » présentés dans les tableaux 48 et 49 on s'aperçoit qu'en hiver la source principale des acides gras de la ration alimentaire des vaches laitières est constituée par les lipides du concentré pour celles qui en reçoivent plusieurs kilos par jour.

Sans doute le choix de ce concentré constituerait-il le moyen le plus accessible de modifier la nature de la matière grasse du lait, en hiver.

La matière grasse du concentré « céréales » est riche en acide linoléique, mais cette matière grasse ne représente que 2 à 3 p. 100 du poids sec. La quantité d'hydrates de carbone introduite dans l'alimentation par le concentré est par contre très importante. Or, à partir des hydrates de carbone et de leurs produits de dégradation, la glande mammaire synthétise comme les autres tissus des acides gras saturés à nombre pair d'atomes de carbone.

Si l'on désire réduire cette fraction d'acides gras saturés, trop élevée en hiver — car un « beurre de qualité » doit avoir un indice d'iode voisin de 35 — il faudrait réduire la proportion d'hydrates de carbone de la ration.

C. — ORIGINE DES ACIDES RAMIFIÉS

On ne décèle pratiquement pas d'acides ramifiés dans la ration. Le seul aliment qui semble cependant en renfermer, une quantité d'ailleurs faible, est l'ensilage. La présence des acides ramifiés dans l'ensilage illustre les modifications que les fermentations microbiennes peuvent apporter au niveau des acides gras.

Mais la quantité d'acides gras ramifiés présents dans le lait est nettement supérieure à la quantité ingérée. La biosynthèse des acides ramifiés supérieurs à

partir par exemple des acides volatils ramifiés (isobutyrique, isovalérique ou 2-méthylbutyrique) provenant de la dégradation des acides aminés et trouvés dans le rumen (ANNISON (5), 1954) ne semble pas avoir été démontrée *in vivo* (VERBEKE *et al.* (107), 1959), alors que beaucoup d'arguments appuient l'hypothèse de l'origine microbienne des acides ramifiés du lait.

Les lipides du protoplasme des microorganismes du rumen contiennent une quantité importante d'acides ramifiés, *iso* C₁₅ et *iso* C₁₇ en particulier (SAITO (86), 1960 ; ALLISON *et al.* (3) ; 1962 ; KEENEY *et al.* (55), 1962). Les acides gras ramifiés d'origine microbienne sont métabolisés et suivent le système circulatoire. Les analyses de KEENEY *et al.* (55) (1962) montrent qu'ils existent au niveau des différents constituants lipidiques du sérum de sang de bovin (glycérides et acides libres, esters de cholestérol et phospholipides).

On peut admettre que les acides ramifiés parviennent à la glande mammaire sous une forme ou une autre, qu'ils y sont libérés et constituent avec les autres acides gras, le « pool » d'acides gras qui existe vraisemblablement à ce niveau (LUICK *et* LUCAS (68), 1962 ; PATTON *et* CARTHY (79), 1963) pour être ensuite réincorporés dans les glycérides et les phospholipides du lait où leur présence a été démontrée (BADINGS (8), 1962 ; MATTSSON (72), 1962 ; SMITH *et* LOWRY (99), 1962).

Cette origine microbienne des acides gras ramifiés du lait de vache, est également rappelée dans deux revues récentes présentées respectivement par GARTON (32) (1963) et KAY *et* HOBSON (54) (1963).

D. — ORIGINE DE LA GRAISSE DU LAIT SÉCRÉTÉE PAR LA GLANDE MAMMAIRE

Nous savons que les acides gras du lait ont pour origine les acides gras des lipides plasmatiques et les acides gras synthétisés *in situ* par la glande mammaire.

L'étude quantitative que nous venons de présenter nous permet de préciser quelques points.

Ainsi on ne trouve pratiquement pas d'acides à moins de 16 atomes de carbone dans les lipides alimentaires des vaches laitières. Ces acides, comme nous le savons, sont essentiellement d'origine biosynthétique. La constance des rapports acide laurique/acide caprique (C₁₂/C₁₀) ou acide myristique/acide laurique (C₁₄/C₁₂), d'un beurre à l'autre montre que la biosynthèse au niveau de la glande mammaire est sous la dépendance d'un facteur de nature hormonale sans doute. Les acides à chaîne longue, essentiellement à 18 atomes de carbone, proviennent, admet-on, des acides gras du sérum. Si l'on observe le rapport des quantités d'acide oléique et d'acide stéarique produites par les vaches laitières dans le même temps, on constate que ce rapport reste très constant (de 1,9 à 2,1) alors qu'au niveau des apports alimentaires, il varie dans de larges proportions. Les acides stéarique et oléique peuvent aussi être formés au niveau du rumen par suite de l'hydrogénation des acides très insaturés de la ration. Ces derniers (linoléique et linolénique) se trouvent en quantités également très variables dans les rations de chacune des vaches laitières.

La constance du rapport acide oléique/acide stéarique dans la graisse du lait, — tout au moins du lait produit au cours de cette expérience — prouve que ce rapport est fixé au niveau de la glande mammaire, au moment même de la sécrétion.

L'existence d'un rapport défini, acide oléique/acide stéarique explique l'évolu-

tion dans le même sens des taux respectifs d'acide oléique et d'acide stéarique constatée au cours de la saison par exemple, et étudiée dans la première partie de ce travail.

Récemment PATTON et McCARTHY (79) (1963) ont noté la même valeur du rapport acide oléique/acide stéarique dans les esters du cholestérol et les triglycérides du lait de vache, suggérant l'appartenance antérieure des acides oléique et stéarique au même « pool » d'acide gras. Mais nous ignorons le facteur responsable de la fixation à un taux déterminé de ce rapport. L'activité déshydrogénante, récemment mise en évidence au niveau de la glande mammaire de la vache laitière, par LAURYSENS *et al.* (63) (1963), joue sans doute un rôle dans l'établissement du rapport oléique/stéarique.

Cette étude a permis de montrer l'importance de la « sélection » effectuée par la glande mammaire parmi les acides gras disponibles, sélection qui commanderait ensuite un apport biosynthétique précédant la sécrétion.

CONCLUSIONS

Nous avons au cours de cette étude précisé la constitution des acides gras des glycérides du beurre en fonction des conditions saisonnières d'alimentation de la vache et selon la nature des lipides de la ration.

Nous avons pratiquement passé en revue les différents types d'alimentation : nourriture exclusivement herbacée pendant la période de pâturage, alimentation hivernale comportant la distribution d'aliments variés (betteraves, ensilage, foin, concentré), distribution de suppléments riches en lipides. Dans tous les cas nous avons cherché à mettre en évidence la répercussion de la constitution des lipides de la ration sur celle des lipides du beurre. Volontairement, et quelquefois au détriment de la netteté de certains résultats, nous avons eu le constant souci de n'effectuer que des expérimentations « normales », comportant la distribution d'aliments divers ou de suppléments définis, en quantités toujours admises par les zootechniciens.

Dans la première partie la constitution en acides gras du beurre est étudiée parallèlement aux variations saisonnières d'alimentation des vaches laitières.

La période de mise au pâturage des vaches laitières a fait l'objet d'une étude approfondie. Cette période recouvre les deux ou trois semaines encadrant le jour de sortie au pâturage. Il se produit alors un bouleversement complet du régime alimentaire des vaches laitières qui se répercute immédiatement au niveau de la composition des acides gras du beurre. L'indice d'iode s'élève de plus de 12 unités en 48 heures, les taux des acides stéarique et oléique s'élèvent, le taux de l'acide palmitique diminue, les taux des acides myristique et laurique diminuent plus nettement encore. Au niveau des acides polyinsaturés on note des modifications importantes : le taux de l'acide linoléique double, celui des diènes conjugués double ou triple ; par contre les taux des acides linoléique et arachidonique semblent peu affectés par les changements de régime alimentaire.

Les taux respectifs des divers acides polyinsaturés du beurre ont été déterminés au cours d'une année entière. Les résultats sont présentés dans le chapitre II. Les différences dans l'évolution du taux de chaque acide polyinsaturé (diène conjugué, linoléique, linoléique et arachidonique) déjà relevées lors de la période de mise en pâturage, ont été confirmées.

La présence d'acide diène conjugué dans le beurre est liée à la présence d'une quantité notable d'herbe ou de fourrages verts dans l'alimentation des vaches laitières.

Le taux d'acide linoléique du beurre, relativement faible — il ne dépasse pas 1,5 p. 100 des acides totaux dans les conditions habituelles d'alimentation des vaches laitières —, est au contraire légèrement plus élevé pendant la période de stabulation

que pendant la période de pâturage mais la variation observée est de très faible amplitude comparée à celle qui concerne l'acide diène conjugué.

Ces deux acides diènes du beurre ont donc nécessairement une origine différente.

L'acide vaccénique a fait l'objet d'une étude particulière développée dans le chapitre III. La présence de cet acide dans le beurre est liée, au moins partiellement, à la nature du régime alimentaire des vaches laitières et plus précisément à la présence d'herbe jeune (printemps et automne) dans ce régime, ce qui correspond à un apport considérable d'acide linoléique. L'hypothèse d'une origine microbienne, d'une partie au moins de cet acide peut être appuyée par un certain nombre d'arguments.

Dans la seconde partie du mémoire présenté, nous avons étudié plus directement la répercussion de la constitution des lipides alimentaires sur celle des lipides du beurre.

En premier lieu, nous avons présenté une étude originale sur les lipides d'une variété de fourrage : la Luzerne Flamande très souvent distribuée aux vaches laitières.

L'intérêt de cette étude est d'avoir montré que les acides gras de ce tissu végétal ne se trouvaient pas préférentiellement sous forme de glycérides mais tout autant sous forme de glucido-lipides. Ces composés permettent un facile transport des acides gras dans un milieu aqueux et sont facilement hydrolysés par les bactéries du rumen, libérant ainsi une grande quantité d'acide linoléique, constituant principal des acides gras de la Luzerne Flamande.

Les acides gras polyinsaturés de l'herbe de prairie ont été étudiés dans le deuxième chapitre, parallèlement à l'étude des acides gras du beurre. La teneur en acides gras totaux de l'herbe et le taux d'acide linoléique s'abaissent considérablement en fonction du stade de végétation de la plante.

Ceci permet d'expliquer au moins partiellement les variations observées de l'acide vaccénique et de l'acide diène conjugué, spécialement pendant la période de pâturage. Nous avons en effet établi que la quantité d'acide diène conjugué présente dans le lait était proportionnelle à la quantité d'acide linoléique dans la ration.

Le chapitre III de cette seconde partie est consacré à l'étude de la répercussion des lipides de divers aliments distribués en supplément aux vaches laitières, sur les acides gras du beurre.

L'addition de graisse de coprah à la ration, entraîne une augmentation du taux d'acide laurique dans le beurre, modifiant ainsi le rapport C_{12}/C_{10} utilisé comme critère de pureté du beurre. Une modification au niveau des acides polyinsaturés non conjugués est par ailleurs relevée.

L'addition d'huile de soja permet d'élever le taux d'acide linoléique du beurre, mais avec un rendement très faible puisque ce taux s'élève de 1,2 à 2,4 p. 100 des acides totaux pour une addition à la ration de 300 g environ d'huile de soja (par vache et par jour).

Des résultats similaires sont obtenus par l'addition d'huile de lin à la ration. Avec une distribution de 400 g d'huile de lin, par vache et par jour, on observe une faible augmentation du taux d'acide linoléique dans le beurre (0,7 à 1,3 p. 100). Le taux d'acide linoléique reste constant.

Au cours de ces deux expériences, le taux des acides dominants du beurre (palmitique et myristique d'une part, oléique et stéarique d'autre part) varient considérablement.

A cette variabilité s'oppose la relative constance de teneur des lipides totaux du beurre en acides polyinsaturés.

Dans la troisième partie nous avons comparé les acides gras ingérés et les acides gras présents dans le lait. Les acides gras des divers constituants de la ration (foin, ensilage, betteraves, concentré) ont été étudiés.

Une similitude de nature entre les acides gras présents dans ces lipides végétaux et les acides gras du beurre a été relevée. La présence probable d'un acide monoène à 15 atomes de carbone dans les acides gras de la betterave a été observée.

La comparaison entre les acides gras de la ration et les acides gras du lait sécrété, montre qu'il existe une perte considérable d'acides polyinsaturés, compensée par un gain considérable en acides saturés de 4 à 16 atomes de carbone dont on connaît l'origine biosynthétique au niveau de la glande mammaire, en acides oléique et stéarique dont l'origine se situe, au moins partiellement, au niveau du rumen, et enfin gain considérable des acides à nombre impair d'atomes de carbone et plus encore des acides ramifiés à 15 et 17 atomes de carbone principalement. Ce dernier résultat met en évidence le rôle important de la flore digestive dans l'origine de certains acides mineurs du beurre.

Les acides gras de la ration des vaches laitières jouent donc un rôle considérable dans l'établissement définitif de la constitution en acides gras du beurre ; mais notre étude met bien en évidence les limites étroites de ces variations, et fait ressortir la complexité des facteurs de régulation intervenant au niveau du rumen et du tractus digestif, au niveau du sang circulant, en particulier lors de la traversée du foie, organe régulateur par excellence, enfin au niveau de la glande mammaire où s'opèrent une captation sélective d'acides gras plasmatiques et une biosynthèse d'acides gras spécifiques.

SUMMARY

EFFECT ON THE CHEMICAL COMPOSITION OF DAIRY BUTTER OF THE COMPOSITION OF THE FEED

The author investigated the variations in the relative proportions of fatty acids in butter in terms of the feeding conditions of dairy cattle.

In his introduction the author reviews current knowledge on the origin of fatty acids of lipids (glycerides) in milk. These are known to come from two distinct sources : fatty acids derived from lipids in blood plasma, and fatty acids synthesized at the level of the mammary gland.

This dual origin allows of the majority of the experimental results obtained in the course of this work to be interpreted.

In a first part the variations observed in the fatty acids of butter are described in parallel with seasonal fluctuations in the feed of dairy cattle.

In three chapters the variations of the major acids of butter (myristic, palmitic, stearic and oleic), and relative proportions the polyunsaturated acids (linoleic, conjugated dienic, linolenic, and arachidonic) are examined in detail. The period of first grazing of dairy cattle has been the object of a great deal of investigations. The results shed light on the close relationship existing between the nature of the diet, more specifically the presence of fresh grass, and the composition of the fatty acids in the butter.

Introducing fresh grass into the feed raises the proportion of stearic and oleic acids and lowers the proportion of palmitic, myristic and lauric acids. As regards the polyunsaturated acids (which altogether account for some 5 p. 100 of total acids in butter), the proportion of conjugated dienic acid and of linolenic acid increases substantially. As against this, the content of linoleic and arachidonic acids seems little affected by changes in the diet.

Vaccenic acid is the subject of a particular study which is treated under chapter 3.

In the second part of the work the author investigates the direct repercussions of the constitution of alimentary lipids on that of the butter lipids.

Special study has been made in the case of a variety of forage, the *Flemish* lucerne. The fatty acids of this plant tissue are largely present in 'glucido-lipid' form. Such compounds provide easy transport of fatty acids through the liquid medium and are readily hydrolyzed by bacteria in the rumen, thereby liberating large quantities of linolenic acid which is a main constituent of the fatty acids of *Flemish* lucerne.

The polyunsaturated fatty acids in pasture grass are studied in chapter 2, in parallel with a study of the fatty acids in butter. A quantitative relationship is established between the amount of linolenic acid in the feed and the amount of conjugated dienic acid present in the milk glycerides.

Chapter 3 is devoted to studying the repercussions on the fatty acids of butter, of the lipids in various ingredients given as additives to the feed of milk cows.

Addition of copra fat to the feed brings about an increase in the lauric acid content of butter, thus modifying the C_{12}/C_{10} ratio used as criterion of purity in butter.

Addition of soya oil raises the linoleic acid content, but efficiency is very low since the proportion rises by only 1.2 p. 100 to 2.4 p. 100 of total acids for an addition to the ration of about 300 g of soya oil, per cow and per day. When 400 g of linseed oil are added to the feed per cow and per day, an increase in the butter of the linolenic acid content from 0.5 to 1.3 p. 100 and of the conjugated dienic acid content from 0.7 to 1.3 p. 100, was observed.

In the course of the experiments a considerable variation was observed in the respective proportions of the major acids.

In a third part of the study the author compares quantitatively the fatty acids in the feed with the fatty acids of lipids in the secreted milk.

The comparison brings to light a considerable depreciation of the polyunsaturated acids, which is compensated by a gain of the saturated acids of between 4 and 16 carbon atoms (of biosynthetic origin), of oleic and stearic acids (formed at least partly at the level of the rumen), and of branched fatty acids, notably those of 15 and 17 carbon atoms.

This result sheds light on the important role of the digestive flora on the origin of certain minor fatty acids in butter.

ANNEXE

TABEAU I

LES ACIDES GRAS DU BEURRE

Acides saturés.

- Normaux à nombre pair d'atomes de carbone
- Normaux à nombre impair d'atomes de carbone
- Ramifiés

Acides insaturés.

- Monoènes
- Polyènes.

Acides saturés normaux à nombre pair d'atomes de carbone

Nombre d'atomes de carbone	Nom commun	Nomenclature systématique	Formule	Désignation (dans la présente étude)
4.....	Butyrique	<i>n</i> -butanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{COOH}$	C ₄ ou 4 : 0
6.....	Caproïque	<i>n</i> -hexanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{COOH}$	C ₆ ou 6 : 0
8.....	Caprylique	<i>n</i> -octanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$	C ₈ ou 8 : 0
10.....	Caprique	<i>n</i> -décanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	C ₁₀ ou 10 : 0
12.....	Laurique	<i>n</i> -dodécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	C ₁₂ ou 12 : 0
14.....	Myristique	<i>n</i> -tétradécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	C ₁₄ ou 14 : 0
16.....	Palmitique	<i>n</i> -hexadécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$	C ₁₆ ou 16 : 0
18.....	Stéarique	<i>n</i> -octodécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{16}\text{COOH}$	C ₁₈ ou 18 : 0
20.....	Arachidique	<i>n</i> -eicosanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{18}\text{COOH}$	C ₂₀ ou 20 : 0
22.....	Béhénique	<i>n</i> -docosanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{20}\text{COOH}$	C ₂₂ ou 22 : 0
24.....	Lignocérique	<i>n</i> -tétracosanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{22}\text{COOH}$	C ₂₄ ou 24 : 0
26.....	Cérotique	<i>n</i> -hexacosanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{24}\text{COOH}$	C ₂₆ ou 26 : 0

Acides saturés normaux à nombre impair d'atomes de carbone

Nombre d'atomes de carbone	Nom commun	Nomenclature systématique	Formule	Désignation (dans la présente étude)
3.....	Propionique	<i>n</i> -propanoïque	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{COOH}$	C ₃ ou 3 : 0
5.....	Valérique	<i>n</i> -pentanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	C ₅ ou 5 : 0
7.....	Pélargonique	<i>n</i> -heptanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$	C ₇ ou 7 : 0
9.....		<i>n</i> -nonanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	C ₉ ou 9 : 0
11.....		<i>n</i> -undécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	C ₁₁ ou 11 : 0
13.....	Margarique	<i>n</i> -tridécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	C ₁₃ ou 13 : 0
15.....		<i>n</i> -pentadécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$	C ₁₅ ou 15 : 0
17.....		<i>n</i> -heptadécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{COOH}$	C ₁₇ ou 17 : 0
19.....		<i>n</i> -nonadécanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{COOH}$	C ₁₉ ou 19 : 0
21.....		<i>n</i> -hénéicosanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{19}\text{COOH}$	C ₂₁ ou 21 : 0
23.....		<i>n</i> -tricosanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{21}\text{COOH}$	C ₂₃ ou 23 : 0
25.....		<i>n</i> -pentacosanoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{23}\text{COOH}$	C ₂₅ ou 25 : 0

Acides saturés ramifiés

Nombre d'atomes de carbone	Nom commun	Nomenclature systématique	Formule	Désignation dans la présente étude
5	isovalérique	3-méthylbutanoïque	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{COOH}$	<i>iso</i> C ₅ ou i 5 : 0
9	isocaprique	méthyl-octanoïque	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_5\text{COOH}$ (?)	<i>iso</i> C ₉ ou i 9 : 0
10	isolaurique	méthyl-nonanoïque	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_6\text{COOH}$ (?)	<i>iso</i> C ₁₀ ou i 10 : 0
11	(<i>iso</i>)	méthyl-décanoïque	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$ (?)	<i>iso</i> C ₁₁ ou i 11 : 0
12	(<i>anteiso</i>)	méthyl-undécanoïque	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$ (?)	<i>iso</i> C ₁₂ ou i 12 : 0
13	isomyristique	11-méthyl-dodécanoïque	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	<i>iso</i> C ₁₃ ou i 13 : 0
13	(<i>iso</i>)	12-méthyl-dodécanoïque	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_8\text{COOH}$	<i>anteiso</i> C ₁₃ ou i 13 : 0
14	(<i>iso</i>)	13-méthyl-tridécanoïque	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$ (?)	<i>iso</i> C ₁₄ ou i 14 : 0
15	isopalmitique	13-méthyl-tétradécanoïque	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	<i>iso</i> C ₁₅ ou i 15 : 0
15	(<i>anteiso</i>)	12-méthyl-pentadécanoïque	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_{10}\text{COOH}$	<i>anteiso</i> C ₁₅ ou i 15 : 0
16	(<i>iso</i>)	15-méthyl-hexadécanoïque	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$ (?)	<i>iso</i> C ₁₆ ou i 16 : 0
17	(<i>anteiso</i>)	14-méthyl-hexadécanoïque	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH}$	<i>iso</i> C ₁₇ ou i 17 : 0
17	isostéarique	méthyl-nonadécanoïque	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_{12}\text{COOH}$	<i>anteiso</i> C ₁₇ ou i 17 : 0
18	(multiramifié)	3, 7, 11, 15-tétraméthyl-hexadécanoïque	$(\text{CH}_3)_2\text{CH}(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH}$ (?)	<i>iso</i> C ₁₈ ou i 18 : 0
20			$\text{CH}_3\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_3\text{CH}(\text{CH}_3)(\text{CH}_2)_3\text{CH}_2\text{COOH}$	<i>iso</i> C ₂₀ ou i 20 : 0

Acides insaturés monoènes

Nombre d'atomes de carbone	Nom commun	Nomenclature systématique	Formule	Désignation dans la présente étude
10	Caproléique	<i>cis</i> -9-décénoïque	$\text{CH}_2 : \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	10 : 1
10		<i>trans</i> -9-décénoïque		
12	Lauroléique	<i>cis</i> -9-dodécénoïque	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH} : \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	12 : 1
12		<i>trans</i> -9-dodécénoïque		
12		11-dodécénoïque	$\text{CH}_2 : \text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	
14	Myristoléique	<i>cis</i> -9-tétradécénoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH} : \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	14 : 1
14		<i>trans</i> -9-tétradécénoïque		
14		13-tétradécénoïque	$\text{CH}_2 : \text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH}$	
15		pentadécénoïque		15 : 1
16	Palmitoléique	<i>cis</i> -9-hexadécénoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_5\text{CH} : \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	16 : 1
16		<i>trans</i> -9-hexadécénoïque		
17		<i>cis</i> -9-heptadécénoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_6\text{CH} : \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	17 : 1
18	Oléique	<i>cis</i> -9-octadécénoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH} : \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18 : 1
18		<i>cis</i> -?-octadécénoïque		
18	Vaccénique	<i>trans</i> -11-octadécénoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3\text{CH} : \text{CH}(\text{CH}_2)_9\text{COOH}$	
18		<i>trans</i> -10-octadécénoïque		
18		<i>trans</i> -16-octadécénoïque	$\text{CH}_3\text{CH} : \text{CH}(\text{CH}_2)_{14}\text{COOH} (?)$	
19		nonadécénoïque		19 : 1
20	Gadoléique (?)	9-eicosénoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH} : \text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH} (?)$	20 : 1
21		hénéicosénoïque		21 : 1
22	Cétoléique (?) ou Érucique (?)	11-ou-13-docosénoïque(?)	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_9\text{CH} : \text{CH}(\text{CH}_2)_8\text{COOH} (?)$ ou $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH} : \text{CH}(\text{CH}_2)_{11}\text{COOH} (?)$	22 : 1
23		tricosénoïque		23 : 1
24	Nervonique (?)	15-tétracosénoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_7\text{CH} : \text{CH}(\text{CH}_2)_{13}\text{COOH} (?)$	24 : 1

Acides insaturés polyènes

a) Les acides essentiels

Groupe	Nombre d'atomes de carbone	Position des doubles liaisons	Configuration stéréochimique	Nom commun	Nomenclature systématique	Formule	Désignation dans la présente étude
Diènes	18	non conjuguée	<i>cis, cis</i>	Linoléique	<i>cis, cis</i> -9, 12 octadécadiénoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}:\text{CHCH}_2\text{CH}:\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18 : 2
Triènes	18	non conjuguée	<i>cis, cis, cis</i>	Linolénique	<i>cis, cis, cis</i> -9, 12, 15 octadécatriénoïque	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}:\text{CHCH}_2\text{CH}:\text{CHCH}_2\text{CH}:\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{COOH}$	18 : 3
Tétraènes	20	non conjuguée	toute <i>cis</i>	Arachidonique	<i>cis, cis, cis cis</i> -5, 8, 11, 14 eicosatétraénoïque	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}:\text{CHCH}_2\text{CH}:\text{CHCH}_2\text{CH}:\text{CHCH}_2\text{CH}:\text{CH}(\text{CH}_2)_3\text{COOH}$	20 : 4

b) Les autres acides gras polyènes

Groupe	Nombre d'atomes de carbone	Position des doubles liaisons	Configuration stéréochimique	Désignation dans la présente étude
Diènes	18	non conjuguée	<i>cis, trans</i>	18 : 2
	18	non conjuguée	<i>trans, cis</i>	18 : 2
	18	non conjuguée	<i>cis, trans</i>	18 : 2
	18	conjuguée	<i>cis, trans</i>	18 : 2
	18	conjuguée	<i>trans, trans</i>	18 : 2
	20			20 : 2
Triènes	22			22 : 2
	18			18 : 3
	20	conjuguée	toute <i>cis</i>	20 : 3
Tétraènes	22	conjuguée		22 : 3
	20			22 : 4
Pentaènes	22	non conjuguée	toute <i>cis</i>	20 : 5
	22			22 : 5

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) ALLEN R. R. et KIESS A. A., 1955. Isomerization during hydrogenation. I. Oleic acid. *J. Amer. Oil chem. Soc.*, **32**, 400.
- (2) ALLEN R. R. et KIESS A. A., 1956. Isomerization during hydrogenation. III. Linoleic acid. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **33**, 355.
- (3) ALLISON M. J., BRYANT M. P., KEENEY M. et KATZ I., 1961. The metabolic fate of isovalerate in *Ruminococcus flavefaciens*. *J. Dairy Sci.*, **44**, 1203.
- (4) AMAT G., 1953. Mise au point d'une nouvelle technique de dosage de l'acide élaïdique. *Arch. Sci. Phys. (Paris)* **9**.
- (5) ANNISON E. F., 1954. Some observations on volatile fatty acids in the sheep's rumen. *Biochem. J.*, **59**, 400.
- (6) AURIOL P. et JARRIGE R., 1962. Possibilités de modifier la composition du lait. *Bull. Ann. Fed. Intern. Lait.*, **II**, 217.
- (7) BADINGS H. T., 1962. Fatty acid composition of cow's milk phospholipids as determined by gas chromatography and thin-layer chromatography. *Neth. Milk Dairy J.*, **16**, 217.
- (8) BACKDERF H. R. et BROWN J. B., 1958. Further contributions to the nature of the monoethenoic fatty acids of butter fat. *Arch. Biochem. Biophys.*, **96**, 15.
- (9) BERNHARD K., BULOW KOSTER J. von et WAGNER H., 1962. Die enzymatische Dehydrierung der Stearinsäure zu Olsäure. *Helvetica chim. Acta.*, **A 42**, 152.
- (10) BRICE B. A. et SWAIN M. L., 1945. Ultraviolet absorption method for the determination of polyunsaturated constituents in fatty materials. *J. Optical Soc. Amer.*, **35**, 352.
- (11) BRICE B. A., SWAIN M. L., HERB S. F., NICHOLS J. R. et RIEMENSCHNEIDER R. W., 1952. Standardization of spectrophotometric methods for determination of polyunsaturated fatty acids using pure natural acids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **29**, 279.
- (12) BROUWER E., 1944. Sur les modifications de la composition des acides gras de l'herbe pendant la maturation et la conservation. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **63**, 35.
- (13) BROUWER E. et JONKER-SCHAEFFENER M. C. E., 1946. Vaccenic acid in butterfat and the fluctuations in its amount. *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, **65**, 408.
- (14) CARTER H. E., McCLUER R. H. et SLIFER E. D., 1956. Lipids of wheat flour. I. Characterization of galactosyl glycerol components. *J. Amer. Chem. Soc.*, **98**, 3735.
- (15) CHAMPOUGNY J. et LE BRETON E., 1947. Recherches sur le mécanisme d'action de l'amide nicotinique, de la pyridixine et de l'acide panthothénique comme coenzymes de la déshydrogénase des acides gras supérieurs. *C. R. Soc. Biol.*, **141**, 45.
- (16) CLÉMENT G. et MAY P., 1953. Recherches sur le métabolisme des lipides comportant l'emploi d'acides gras à doubles liaisons conjuguées. *J. Physiol. (Paris)*, **45**, 79.
- (17) CORNWELL D., BACKDERF R., WILSON G. et BROWN J., 1953. The *trans*-octadecenoic acid content of butterfat. *Arch. Biochem. Biophys.*, **46**, 364.
- (18) DEMARQUILLY C. et JOURNET M., 1959. Variations de la composition du lait à la mise à l'herbe. *XVI^e Congr. Intern. Lait, Londres*, **A (1)**, 33.
- (19) DEUTSCH A., MATTSSON S. et SWARTLING P., 1958. On the composition of the phospholipid fraction of butter with special regard to the polyenic fatty acids. Report n° 54. *Milk and Research*, Alnarp, Suède.
- (20) McDOWALL F. H., 1962. Studies on the properties of New Zealand butterfats. V. The effect of stage of lactation. *J. Dairy Res.*, **29**, 307.
- (21) McDOWALL F. H., REID C. S. W. et PATCHELL M. R., 1957. Bloat in cattle. VI. Effects of ingestion of linseed oil, soyabean oil, mixed beef and mutton tallow and peanut arachide oil on production and properties of milk and butterfat. *N. Z. J. Sci. Techn.*, **A**, **38**, 1054.
- (22) McDOWALL F. H. et MCGILLIVRAY W. A., 1963. Studies on the properties of New Zealand butterfat. VII. The fatty acid composition of the milk fat of cows grazing on rye-grass et two stages of maturity and the composition of the rye-grass lipids. *J. Dairy Res.*, **30**, 59.
- (23) McDOWELL A. K. R., 1953. The properties of New Zealand butters and butterfats. III. Seasonal variations in the nature of the unsaturated acids of butterfat as estimated by spectrophotometric methods. *J. Dairy Res.*, **20**, 100.

- (24) DUNCAN W. R. H. et GARTON G. A., 1962. The C₁₈ fatty acids of ox plasma lipids. *J. Lip. Res.*, **3**, 53.
- (25) ESPE D. et SMITH V. R., 1952. *Secretion of milk*. The Iowa State College Press, 4th ed., Ames, U. S. A.
- (26) FISHER N., 1960. Wheat lipids. *Recent advances in Food Sciences*, **1**, 226. HAWTHORN J. et MUILEITCH ed., Butterworth. Londres.
- (27) FOLLEY S. J. et NAUGHT M. L., 1961. Biosynthesis of milkfat. In KON S. K. et COWIE A. T « *Milk : the Mammary gland and its secretion* », p. 441. Academic Press, Londres et New York.
- (28) FRANCESCO F. et AVANCINI D., 1961. La sofisticazione del burro con grassi transesterificati. *L. Latte*, **35**, 799.
- (29) GARTON G. A., 1954. The component fatty acids of bovine mammary gland fat. *J. Sci. Food Agric.*, **5**, 247.
- (30) GARTON G. A., 1960. Fatty acid composition of the lipids of pasture grasses. *Nature*, Lond., **187**, 511.
- (31) GARTON G. A., 1960. Lipid metabolism in herbivorous animals. *Nutrition Abstr. Reviews*, **30**, 1.
- (32) GARTON G. A., 1963. The composition and biosynthesis of milk lipids. *J. Lip. Res.*, **4**, 237.
- (33) GARTON G. A. et DUNCAN W. R. H., 1957. Blood lipids. I. Plasma lipids of the lactating cow : chromatography on silicic acid. *Biochem. J.*, **60**, 240.
- (34) GARTON G. A., LOUGH A. K. et VIOQUE E., 1961. Glyceride hydrolysis and glycerol fermentation by sheep rumen contents. *J. gen. Microbiol.*, **25**, 215.
- (35) GELHORN A., BENJAMIN W. et WAGNER M., 1962. The *in vitro* incorporation of acetate I-C¹⁴ into individual fatty acids of adipose tissue from young and old rats. *J. Lip. Res.*, **3**, 314.
- (36) GLASCOCK R. F., DUNCOMBE W. G. et REINIUS L. R., 1956. Studies on the origin of milk fat. 2. The secretion of dietary long chain fatty acids in milk fat by ruminants. *Biochem. J.*, **62**, 535.
- (37) GROSSFELD J. et SIMMER A., 1930. *Z. Untersuch. Nahr. Genussm.*, **59**, 239 ; cités par BROUWER E, et JONKER-SCHAEFFENER M. G. E., 1946.
- (38) HANSEN R. P. et SHORLAND F. B., 1952. Seasonal variations in fatty acid composition of New Zealand butterfat. *Biochem. J.*, **52**, 207.
- (39) HANSEN R. P., SHORLAND F. B. et COOKE N. J., 1960. The isolation of *cis* 9-heptadecenoic acid from butterfat. *Biochem. J.*, **77**, 64.
- (40) HARTMAN L., SHORLAND F. B. et McDONALD I. R. C., 1954. Occurrence of *trans* acids in animal fats. *Nature* (Lond.), **174**, 185.
- (41) HARTMAN L., SHORLAND F. B. et MOIR R., 1956. Occurrence of *trans* unsaturated fatty acids in horse faeces. *Nature* (Lond.), **178**, 1057.
- (42) HAWKE J. C., 1963. Studies on the properties of New Zealand butterfat. VIII. The fatty acid composition of the milk fat of cows grazing on rye-grass et two stages of maturity and the composition of the rye-grass lipids. *J. Dairy Res.*, **30**, 67.
- (43) HERB S. F., MAGIDMAN P., LUDDY F. R. et RIEMENSCHNEIDER R. W., 1962. Fatty acids of cow's milk. B. Composition by gas-liquid chromatography aided by other methods of fractionation. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **39**, 142.
- (44) HILDITCH T. P., 1947. *The chemical constitution of natural fats*. Chapman et Hall, ed., Londres.
- (45) HIRSCH J. et AHRENS J., 1958. The separation of complex lipid mixtures by the use of silicic acid chromatography. *J. Biol. Chem.*, **233**, 311.
- (46) HOFMANN K., 1953. The chemical nature of fatty acids of bacterial origin *Rec. Chem. Prog.*, **14**, 7.
- (47) HOFMANN K., HENIS D. B. et PANOS C., 1957. Fatty acid interconversions in lactobacilli. *J. Biol. Chem.*, **228**, 349.
- (48) HOLMAN R. I., LUNBERG W. O. et MALKIN T., 1954. *Progress in the chemistry of fats and other lipids*. Pergamon Press, Londres. IV, p. 228 (PITT G. A. et MORTON R. A. : Ultraviolet spectrophotometry of fatty acids) .
- (49) HORNING M. G., MARTIN D. B., KARMEN A. et VAGELOS J., 1961. Fatty acid synthesis in adipose tissue. II. Enzymatic synthesis of branched-chain and odd-numbered fatty acids. *J. Biol. Chem.*, **236**, 669.
- (50) JAMES A. T., PEETERS G. et LAURYSENS M., 1956. The metabolism of propionic acid. *Biochem J.*, **64**, 726.
- (51) JASPERSON H. et BURKE F., Cités par HILDITCH T. P., 1947. Dans « *The Chemical constitution of natural fats* », p. 140.
- (52) JENSEN R. G., SMITH K. L., EDMONSON J. E. et MERILAN C. P., 1956. The characteristics of some rumen lactobacilli. *J. Bact.*, **72**, 253.
- (53) JENSEN H., PEDERSON A. H. et OVERGAARD S., 1958. Un dersogelser vedrorende Jersey maelkens anvendelse inden for smorproduktionem. *Beretn. Statens Forsogsmej.*, n° 113.
- (54) KAY R. N. B. et HOBSON P. N., 1963. Reviews of the progress of dairy science. Section A. Physiology. I. Physiology of the rumen. 2. Rumen microbiology. *J. Dairy Res.*, **30**, 261.
- (55) KEENEY M., KATZ I. et ALLISON M. J., 1962. On the probable origine of some milk fatty acids in Rumen microbial lipids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **39**, 198.

- (56) KUZDZAL-SAVOIE S., 1956. Influence du stade de lactation sur les caractéristiques de la matière grasse du beurre. *Ann. Technol. agric.*, **5**, 1.
- (57) KUZDZAL-SAVOIE S., 1959. Influence de la race des vaches laitières sur la composition de la matière grasse et sur la qualité du beurre. Expérimentation conduite à Echiré. *Ann. Technol. agric.*, **8**, 35.
- (58) KUZDZAL-SAVOIE S., 1959. Influence de la race des vaches laitières sur la composition de la matière grasse du lait. Expérimentation conduite au Centre National de Recherches zootechniques, à Jouy-en-Josas. *Ann. Technol. agric.*, **8**, 193.
- (59) KUZDZAL-SAVOIE S., 1959. Influence de l'alimentation et du climat sur la matière grasse du lait. Aspect qualitatif. *Ann. Nutr. Alim.* XIII, A 207.
- (60) KUZDZAL-SAVOIE S. et LUGO B. de, 1957. Influence de la mise à l'herbe du troupeau et de sa rentrée à l'étable sur la composition de la matière grasse du lait. *IV^e Congr. Intern. Nutrition*, Paris. Résumés des communications, p. 24.
- (61) KUZDZAL-SAVOIE S., 1962. Les acides gras du beurre. Connaissances actuelles. *Ann. Technol. agric.*, **11**, 153.
- (62) KUZDZAL-SAVOIE S. et PAQUOT C., 1962. Chromatographie en phase gazeuse et lipochimie. Identification d'un beurre de constitution anormale. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, n° 637, 9 et Oléagineux, **17**, 185.
- (63) LAURYSENS M., VERBEKE R. et PEETERS G., 1961. Metabolism of stearate 1-C¹⁴ in the isolated cow's udder. *J. Lip. Res.*, **2**, 383.
- (64) LE BRETON E. et FERRET S., 1959. Quelques aspects actuels du problème des acides gras indispensables et essentiels. La notion des familles d'acides polyinsaturés et ses conséquences. *Expos. ann. Biochim. med.*, **21**, 135.
- (65) LOUGH A. K. et GARTON G. A., 1957. Blood lipids. II. Plasma lipids of the lactating cow : fatty acid composition of the sterol esters and triglycerides. *Biochem. J.*, **67**, 345.
- (66) LOUGH A. K., DUNCAN W. R. H., GARTON G. A. et PEETERS G., 1960. Dans « *Biochemistry of Lipids* », POPJAK G. éd., Oxford, Pergamon Press, p. 64.
- (67) LUICK J. R., 1960. Milk fat synthesis. *J. Dairy Sci.*, **43**, 1334.
- (68) LUICK J. R. et LUCAS J. M., 1962. Further studies on milk fat synthesis. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.*, **110**, 275.
- (69) MAGIDMAN P., HERB S. F., BARFORD P. H., RIEMENSCHNEIDER R. W., 1962. Fatty acids of cow's milk. A. Techniques employed in supplementing gas liquid chromatography for identification of fatty acids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **39**, 137.
- (70) MANGOLD H. K., 1961. Thin-layer chromatography of lipids. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **38**, 708.
- (71) MARSH J. B. et JAMES A. T., 1962. The conversion of stearic to oleic acid by liver and yeast preparations. *Bioch. Biophys. Acta*, **60**, 320.
- (72) MATTSSON S., 1962. Fatty acids in milk phospholipids. *XVI^e Congr. Inter. Lait*, Copenhague, A (11), 537.
- (73) MATTSSON S., THOME K. E. et SWARTLING P., 1951. Polyunsaturated fatty acids in butter and their influence on the oxidation of butter. 3. Seasonal variation and correlation with peroxide value and oily flavour in butter, from different dairies. *Medd. Statens Mejeriförsök*, n° 35, 1.
- (74) MAY P. et VAUX SAINT-CYR C. de, 1955. Recherches sur le métabolisme de l'acide tétraénoïque conjugué après son ingestion par le Rat. *J. Physiol. (Paris)*, **47**, 243.
- (75) MAYHEAD J. W. et BARNICOAT C. R., 1956. Variations in iodine value of milk fats. *J. Dairy Res.*, **23**, 238.
- (76) O'LEARY W. M., 1959. Studies of the utilization of C¹⁴ labeled octadecenoic acids by *Lactobacillus arabinosus*. *J. Bacteriol.*, **77**, 367.
- (77) PAQUOT C., MERCIER J., LEFORT A. et PERRON R., 1962. *Les méthodes analytiques des lipides simples*. C. N. E. R. N. A., éd., Paris.
- (78) PATTON S. R., MCCARTHY D., EVANS L., JENSEN R. G. et GANDER G. W., 1962. Structure and synthesis of milk fat. III. Utilization of pentadecanoate infused into the lactating goat mammary gland. *J. Dairy Sci.*, **45**, 248.
- (79) PATTON S. et MCCARTHY R. D., 1963. Structure and synthesis of milk fat. IV. Role of the mammary gland with special reference to the cholesterol esters. *J. Dairy Sci.*, **46**, 396.
- (80) PERRY K. D. et BRIGGS C. A. E., 1957. The normal flora of the bovine rumen. IV. Qualitative studies of lactobacilli from cows and calves. *J. Appl. Bact.*, **20**, 119.
- (81) POPJAK G., FRENCH T. H. et FOLLEY S. J., 1951. Utilization of acetate for milk fat synthesis in the lactating goat. *Biochem. J.*, **48**, 411.
- (82) REINART A. et NESBITT J. M., 1956. The unsaturated fatty acid content of milk fat in Manitoba. *XIV^e Congr. Intern. Lait*, Rome, I, 911.
- (83) REISER R., 1951. Hydrogenation of polyunsaturated fatty acids by the ruminants. *Fed. Proc.*, **10**, 236.
- (84) RHODES D. N. et LEA C. H., 1958. On the composition of the phospholipids of cow's milk. *J. Dairy Res.*, **25**, 60.
- (85) RIEL R. R., 1963. Physicochemical characteristics of Canadian Milk fat. Unsaturated fatty acids. *J. Dairy Sci.*, **46**, 102.

- (86) SAITO K., 1960. Studies on bacterial fatty acids. Structure of subtiloheptadecanoic acids. *J. Biochem. (Japon)*, **47**, 710.
- (87) SAMBASIVARAO K. et BROWN J. B., 1962. The nature of the C₁₈ polyethenoic fatty acids of butterfat. *J. Agric. Food Chem.*, **7**, 124.
- (88) SCOTT W. E., MAGIDMAN P. et RIEMENSCHNEIDER R. W., 1959. Unsaturated fatty acids of butterfat. *J. Agric. Food Chem.*, **7**, 125.
- (89) SHEURBRANDT G. et BLOCH K., 1962. Unsaturated fatty acids in microorganisms. *J. Biol. Chem.*, **237**, 2004.
- (90) SHORLAND F. B., 1953. Animal fats : Recent researches in the fats research laboratory, D. S. I. R., New Zealand. *J. Soc. Food Agric.*, **4**, 497.
- (91) SHORLAND F. B., 1961. Acetone soluble lipids of grasses and others forage plants. II. General observations on the properties of the lipids with special reference to the yield of fatty acids. *J. Sci. Food Agric.*, **12**, 39.
- (92) SHORLAND F. B., 1963. The fatty acids of the depot and milk fats of ruminants. *Fette Seifen Ausrichmittel*, **65**, 302.
- (93) SHORLAND F. B., WEENINK R. O. et JOHNS A. T., 1955. Effect of the rumen on dietary fat. *Nature (London)*, **175**, 1129.
- (94) SHORLAND F. B. et HANSEN R. P., 1957. The minor fatty acid constituents of butterfat. A review. *Dairy Sci. Abstr.*, **19**, 168.
- (95) SHORLAND F. B., WEENINK R. O., JOHNS A. T. et McDONALD I. R. C., 1957. The effect of sheep rumen contents on unsaturated fatty acids. *Biochem. J.*, **67**, 328.
- (96) SMITH I. A. B. et CHIBNALL A. C., 1931. The glycerides fatty acids. I. Cocksfoot and Perennial Ryegrass. *Biochem. J.*, **26**, 218.
- (97) SMITH L. M., FREEMAN N. K. et JACK E. L., 1954. The unsaturated fatty acids of milk fat. III. Geometrical isomerism. *J. Dairy Sci.*, **37**, 399.
- (98) SMITH L. M. et JACK E. L., 1959. Isolation of milk phospholipids and determination of their polyunsaturated fatty acids. *J. Dairy Sci.*, **42**, 767.
- (99) SMITH L. M. et LOWRY R. R., 1962. Fatty acid composition of the phospholipids and other lipids in milk. *J. Dairy Sci.*, **45**, 581.
- (100) SMITH L. M., DUNKLEY W. L. et RONNINGS M., 1963. Influence of linoleic acid content of milk lipids on oxidation of milks and milkfat. *J. Dairy Sci.*, **46**, 7.
- (101) SREENIVASAN B., NOWAKOWSKA J., JONES E. P., SELKE, E., SCHOLFIELD C. R. et DUTTON H. J., 1963. Hydrogenation of linolenate. VII. Separation and identification of isomeric dienes and monoenes. *J. Amer. Oil Chem. Soc.*, **40**, 45.
- (102) STADHOUDERS J. et MULDER H., 1955. The composition of dutch butterfat. I Seasonal variations in the unsaturated fatty acid composition of butterfat. *Neth. Milk Dairy J.*, **9**, 182.
- (103) STADHOUDERS, J. et MULDER H., 1956. The composition of dutch butterfat. II. Seasonal variations in the saturated fatty acid composition of butterfat. *Neth. Milk Dairy J.*, **10**, 53.
- (104) SWARTLING P. et MATSSON S., 1956. On the composition and properties of Jersey milk. *Medd. Statens Mejeriförsök*, n° 47, 1.
- (105) TWITCHELL E., 1921. The precipitation of solid fatty acids with lead acetate in alcoholic solution. *J. Ind. Eng. Chem.*, **13**, 806.
- (106) VAUGHAN M., 1961. The metabolism of adipose tissue, *in vitro*. *J. Lip. Res.*, **2**, 293.
- (107) VERBEKE R., LAURYSENS M., PEETERS G. et JAMES A. T., 1959. Incorporation of DL-(1/C¹⁴) Leucine and (1/C¹⁴) isovaleric acid into milk constituents by the perfused cow's udder. *Biochem. J.*, **73**, 24.
- (108) WEENINK R. O., 1959. A note on the acetone soluble lipids of forage grasses and clovers. *N. Z. J. Science*, **1** 273.
- (109) WEENINK R. O., 1961. Acetone soluble lipids of grasses and other forage plants. I. Galactolipids of Red Clover (*Trifolium pratense*) leaves. *J. Sci. Food Agric.*, **13**, 34.
- (110) WEENINK R. O., 1962. Minor constituents of the acetone soluble lipids of Red Clover leaves. *Biochem. J.*, **82**, 523.
- (111) WOOD F. W. et HAAB, W., 1957. Seasonal and regional variations in the insaturated acids of Alberta butterfat. *Canad. J. Anim. Sci.*, **37**, 1.
- (112) WRIGHT D. E., 1959. Hydrogenation of lipids by rumen protozoa. *Nature (London)*, **184**, 875.
- (113) WRIGHT D. E., 1960. Hydrogenation of chloroplast lipids by rumen bacteria. *Nature (London)*, **185**, 546.
- (114) WRIGHT D. E., 1961. Bloat in cattle. XX. Lipase activity of rumen microorganisms. *N. Z. J. Agric. Res.*, **4**, 216.

CONTRIBUTION A L'ÉTUDE PHYSIOLOGIQUE DES ACTIONS COMPARÉES DU VIN ET DE L'ÉTHANOL RÔLE DU RÉGIME ALIMENTAIRE IMPORTANCE DU MODE DE VINIFICATION

M. FLANZY, J. PUISAIS, Ch. COMBESCOT, J. DEMARET,
F. REYNOUARD-BRAULT et C. IGERT

*Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude),
Laboratoire départemental d'Analyses de Tours (Indre-et-Loire),
Faculté de Médecine et de Pharmacie de Tours (Indre-et-Loire)*

SOMMAIRE

Les auteurs poursuivant des recherches sur les effets physiologiques comparés des vins et d'une solution hydroalcoolique ont noté le comportement de lots de rats femelles *Wistar* (croissance, tenue générale, réactions). Ils ont mesuré les variations de poids, les quantités des rations et de boisson ingérées.

Ces travaux confirment des résultats antérieurs qui établissent entre des dilutions alcooliques et les vins des différences fondamentales. Toutefois, parmi les vins, des différences sont notées en fonction de leur mode de vinification.

I. — INTRODUCTION

Dans le domaine biologique, les effets du vin sont généralement différents de ceux d'un simple mélange d'alcool et d'eau. Cette constatation ne doit pas nous surprendre car plus de 250 constituants ont déjà été dénombrés dans le vin. Beaucoup de travaux ont d'ailleurs été consacrés à ce problème : nous citerons ceux de PRANDEL en 1930, de ROUGIE en 1950, de FLANZY et CAUSERET en 1952, de M^{me} ASCHKENAZY-LELU en 1958, de MASQUELIER en 1961. Dernièrement un symposium sur les effets physiopathologiques de l'alcool et du vin, tenu à Montpellier, a confirmé ces différences d'effet entre l'alcool et le vin.

Vis-à-vis de la sphère génitale, le vin ne se comporte pas non plus comme un

mélange d'eau et d'alcool : le remplacement de l'eau de boisson par du vin provoque, chez la Ratte, des perturbations importantes du cycle vaginal (ARON, FLANZY, COMBESCOT, PUISAIS, DEMARET, REYNOUARD-BRAULT et IGERT, 1965). L'administration, dans les mêmes conditions, d'une quantité équivalente d'alcool éthylique sous forme d'un mélange d'éthanol et d'eau, ne s'accompagne pas d'irrégularité dans l'apparition des phases d'œstrus, à condition, toutefois, d'assurer à l'animal un régime alimentaire bien équilibré et d'opérer par « accoutumance » (COMBESCOT, DEMARET, N'GORE-KASSI et TRÉMOLIÈRES).

Le vin entraînant des perturbations de l'œstrus plus importantes que le mélange d'alcool et d'eau, il nous est apparu nécessaire de vérifier si ces modifications chez les rattes buvant du vin, n'étaient pas en rapport avec une altération de l'état général consécutive à des troubles digestifs. Cette note relate les résultats de ces investigations. La quantité de nourriture et le volume de liquide absorbés par les rattes tout au long de l'expérience y sont précisés, ainsi que la responsabilité du régime alimentaire.

II. — MÉTHODES ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Les essais ont porté comparativement sur l'alcool et les vins.

A. Expérience concernant l'éthanol

Les animaux sont répartis en trois lots de 5 rattes chacun :

- les animaux du premier lot reçoivent un régime artificiel bien équilibré ;
- un deuxième lot est alimenté au moyen d'un régime artificiel enrichi en lipides ;
- les animaux du troisième lot reçoivent un régime artificiel enrichi à la fois en lipides et en protides.

On trouvera ci-dessous la composition exacte de ces trois régimes rapportée à 1 000 g.

	<i>Équilibré témoin</i>	<i>Hyperlipidique</i>	<i>Hyperlipidoprotidique</i>
	(g)	(g)	(g)
Farine de blé	612	199	17
Son	32	10	1
Caséine	286	333	500
Mélange salin	29	29	40
Beurre	41	429	432
Complexe B	1 unité	1 unité	1,5 unité
Vitadone	0,25 cm ³	0 goutte	0,12 cm ³

Composition du mélange salin (g)

Citrate trisodique	188
Citrate de potassium	130
Phosphate bipotassique	288
Phosphate tricalcique	124
Carbonate de calcium	220
Carbonate de magnésium	33,6
Sulfate de magnésium	24

Composition du complexe B (mg)
(une unité = 250 mg)

Vitamine B ₁	15
Vitamine B ₂	15
Vitamine B ₆	10
Nicotinamide	50
Pantothénate de calcium	25
Amidon	135

Composition de la Vitadone

Vitamine A	50 000 UI
Vitamine D ₂	10 000 UI

par ml de solution huileuse

Pendant une période d'adaptation de 30 jours, les animaux des trois lots reçoivent comme boisson de l'eau pure.

Puis, l'eau de boisson est remplacée pour tous les animaux par un mélange d'éthanol et d'eau dans la proportion de 150 ml d'alcool à 95° pour 850 ml d'eau. Cela donne un liquide titrant 14 p. 100 d'alcool. La consommation de nourriture est notée chaque jour pour chaque lot pendant toute la durée de l'expérience, soit 195 jours.

B. Expérience concernant les vins

Les rattes sont réparties en quatre lots de 5 animaux chacun.

Pendant les 21 premiers jours correspondant à la période d'observation, tous les animaux reçoivent comme nourriture le régime équilibré témoin décrit plus haut et comme boisson de l'eau pure.

Au cours des 148 jours suivants, la nourriture est toujours constituée par le régime équilibré témoin, mais la boisson diffère suivant les quatre lots d'animaux :

- les animaux du premier lot reçoivent de l'eau pure ;
- les animaux du deuxième lot reçoivent du vin A ;
- les animaux du troisième lot reçoivent du vin B ;
- les animaux du quatrième lot reçoivent du vin C.

Pendant une autre période de 89 jours, les animaux des quatre lots reçoivent toujours la même boisson, c'est-à-dire soit de l'eau pure, soit les vins A, B ou C, mais le régime équilibré est remplacé par le régime hyperlipidique.

Pendant toute la durée de l'expérience la quantité de boisson et de nourriture consommée par chaque lot d'animaux est enregistrée chaque jour.

Ces trois sortes de vins proviennent d'une seule variété de Raisin *Vitis vinifera*, le Cabernet franc, cultivé sur un terrain silico-argileux reposant sur un fond calcaire de l'aire d'appellation contrôlée « Chinon » (Indre-et-Loire). La vendange, homogène, a été répartie en trois vinifications :

A. — Vinification en rouge après éraflage ; durée de cuvaison 4 jours.

B. — Vinification en rouge après éraflage ; durée de cuvaison 28 jours (pratique traditionnelle en Touraine).

C. — Vinification en rosé sans macération.

Ces trois vins ont reçu trois soutirages et n'ont été ni collés ni filtrés.

L'analyse sommaire est donné dans le tableau 1.

Voici quelques commentaires sur ce tableau :

— le degré alcoolique est établi avec une approximation de ± 0.01 . En tenant compte d'une faible quantité de sucre dans le vin C seulement, on peut admettre que les degrés alcooliques n'ont rien de singulier.

Par contre, l'extrait sec est apparemment aberrant. Nous en discuterons un peu plus loin.

Couleur et indice de permanganate caractérisent bien les trois vins expérimentés. Les chiffres donnés signifient en gros que les composés polyphénoliques suivent une variation normale en allant du vin Rosé C au vin A (le moins macéré) au vin B (le plus macéré).

L'acidité totale, les composants de cette acidité et le pH, sont significatifs de ces trois vins. Le marc facilitant la précipitation de tartre, cette précipitation est d'autant plus grande que le cuvage est prolongé.

La fermentation malolactique a débuté dans le vin A, mais pas dans le vin C ; elle est la plus avancée dans le vin B, ce qui est tout à fait normal. Ces différences s'expliquent par le pH et l'absence ou la présence de SO_2 qui est un inhibiteur de cette fermentation à partir de certaines doses.

Notons enfin la dose de K plus élevée dans les vins A et B, des doses plus élevées de N dans le vin B, ce qui s'explique par le cuvage et sa durée. Les doses plus élevées de Fer dans le vin C s'expliquent par l'action des parties métalliques du pressoir.

TABLEAU I

Composition des vins

	A Rouge 4 jours	B Rouge 28 jours	C Rosé
Aspect	Limpide	Limpide	Limpide
Dégustation.....	Fruité — agréable	Fruité — plein agréable	Léger — agréable nerveux
Couleur (densité optique à 520 μ .)	19	23	6
Examen microscopique.....	Quelques particules amorphes — absence de bactéries et de le- vures en activité	Quelques particules amorphes — absence de bactéries et de le- vures en activité	Quelques particules amorphes — absence de bactéries et de le- vures en activité
Dépôt	Absence	Absence	Absence
Densité à 15°	0,993 8	0,993 5	0,994 4
pH.....	3,10	3,15	3,00
Alcool (distillation) (° GL).....	11,20	11,40	11,20
Extrait sec (g/l)	19,7	19,4	22,4
Matière réductrices.....	0,8	0,9	3,6
Sulfates (mg/l)	27	30	23
Chlorures (mg/l)	46	46	41
Fer +++ (mg/l)	2	3	8
Fer ++ (mg/l)	3	4	6
Cuivre (mg/l)	0	0	0
Potassium (g/l)	1,038	1,062	0,750
Acidité totale.....	5,01	4,33	6,25
Acidité volatile	0,34	0,30	0,19
Acidité fixe	4,67	4,03	6,06
Acide citrique (g/l)	0,05	traces	0,07
Acide malique.....	+	+	+
Acide lactique	+	++	—
SO_2 libre (mg/l)	traces	traces	20
SO_2 total (mg/l)	18	20	52
Azote total (g/l)	0,28	0,35	0,27
Indice de permanganate.....	18,5	31	10

Ceci dit, que penser de l'extrait sec total ?

Le vin C a une dose de matières réductrices supérieures de 2 g environ à celles que l'on a trouvées dans les vins A et B. Cela est normal : les fermentations sont plus rapides et peuvent être plus complètes dans les vins de macération que dans les vins blancs et rosés non macérés.

Par ailleurs, les considérations données sur l'acidité et la fermentation malolactique jouent en faveur d'une augmentation de l'extrait pour les vins C et d'une diminution de l'extrait dans les vins A et B, et plus importante pour le vin B. Dans ces conditions, les extraits ramenés à un même état biochimique nous donneraient des doses d'extrait croissant depuis le vin C jusqu'au vin B qui aurait l'extrait le plus élevé.

On doit donc accepter ces analyses et regretter seulement qu'elles ne soient plus approfondies : (dosage des acides tartrique, malique, lactique et dosage quantitatif et qualitatif des polyphénols).

III. — RÉSULTATS

Nous relaterons, en fonction du régime et de la nature de la boisson : d'une part le comportement des animaux, d'autre part, la quantité de nourriture et de boisson absorbée chaque soir.

A. *Comportement des animaux*a) *Animaux recevant de l'éthanol.*

Il faut envisager séparément le cas des animaux recevant le régime équilibré et celui des rats nourris à l'aide du régime hyperlipidique. En effet, si l'éthanol ne provoque que des intolérances digestives passagères chez les animaux recevant un régime équilibré, il n'en est pas de même pour les rats soumis à un régime trop riche en lipides. Chez ces derniers, le remplacement de l'eau de boisson par de l'eau alcoolisée entraîne presque immédiatement l'apparition de phénomènes diarrhéiques graves, ce qui oblige à les remettre à l'eau au bout de 5 jours. Les troubles digestifs disparaissent alors rapidement ; après un délai de 6 jours l'eau de boisson peut à nouveau être additionnée d'éthanol dans la proportion de 7,1 p. 100.

Le taux d'alcool est ensuite progressivement augmenté jusqu'à atteindre 11,4 p. 100. Pendant 8 jours les rattes ont bu la concentration à 7,1 p. 100, pendant 6 jours une concentration à 9,5. Et la concentration à 11,4 p. 100 est maintenue pendant 100 jours au cours desquels se manifestent encore de temps à autre de brefs épisodes diarrhéiques.

A partir du 103^e jour, l'administration d'alcool à 14,2 p. 100 ne provoque plus de troubles digestifs. Toutefois, au moment du sacrifice, les animaux de ce lot sont maigres et ont un pelage hérissé.

Malheureusement le poids n'a pas été noté.

TABLEAU 2
Poids moyen des rattes

Lot	Au début de l'expérience (g)	Après 169 jours de régime équilibré (g)	Après 37 jours de régime hyperlipidique (g)
Témoin Eau	243	272	284
Vin A	240	266	276
Vin B	216	220	223
Vin C	230	244	256

Remarque : le régime hyperlipidique a été entrepris à l'issue des 169 jours de régime équilibré.

b) *Animaux recevant du vin.*

Les vins A, B et C sont parfaitement supportés quel que soit le régime alimentaire auquel les animaux sont soumis. Nous n'observons pas de signes d'intolérance digestive et le poids des animaux augmente. Ces variations sont données dans le tableau 2.

Si, d'une façon très générale, le poids des animaux augmente on constate que pour le vin A la courbe d'accroissement est — aux erreurs opératoires près — superposable à celle du lot témoin à l'eau ; qu'au contraire, pour le vin B, l'accroissement est faible et que pour le vin C la courbe est intermédiaire, mais plus rapprochée des courbes Témoin et vin A. On aurait le classement suivant :

— Témoin et vin A, vin C, vin B.

B. *Consommation de nourriture*a) *Animaux recevant de l'éthanol.*

Les résultats portent sur quatre périodes de 10 jours.

La première correspond au début de la phase d'adaptation, pendant laquelle les animaux, déjà répartis en trois lots et recevant des régimes alimentaires différents, disposent encore d'eau comme boisson. Les trois autres périodes se situent du 1^{er} au 10^e jour, du 62^e au 72^e jour, et du 135^e au 145^e jours après la mise à l'alcool.

Les résultats sont reportés sur le tableau 3.

TABLEAU 3

Consommation pondérale moyenne en g par animal et par jour

	1 ^{er} lot Régime témoin équilibré	2 ^e lot Régime hyperlipidique	3 ^e lot Régime hyper- lipidoprotidique
Période d'adaptation sans alcool.....	11,9	9,8	10
Période s'étendant du 1 ^{er} au 10 ^e jour après la mise à l'alcool.....	9,1	4,2	7,4
Période s'étendant du 62 ^e au 72 ^e jour après la mise à l'alcool.....	6,4	6,5	7,0
Période s'étendant du 135 ^e au 145 ^e jour après la mise à l'alcool.....	7,4	8,4	6,6

Pour chaque lot d'animaux et pour chaque période d'observation figure un poids de nourriture exprimé en grammes et qui représente la moyenne, rapportée à un animal et à une journée, de la totalité de la nourriture absorbée par l'ensemble des animaux du lot considéré pendant toute la durée de la période envisagée.

Il ressort du tableau ci-dessus que la quantité de nourriture absorbée quotidiennement diminue sensiblement à partir du moment où l'animal boit de l'alcool.

Toutefois, des différences semblent apparaître en fonction de la nature du régime.

Dans le cas du lot témoin après une chute sensible de 11,9 g à 6,4, on note un accroissement à 7,4 g.

Ces constatations sont encore plus sensibles avec le régime hyperlipidique, où la chute est la plus grande au cours de la première période ; un rattrapage plus important se produit au cours de la troisième période.

Enfin, dans le régime hyperlipidoprotidique, la chute est plus régulière et reste continue. On ne constate pas un nouvel accroissement de la consommation.

b) *Animaux recevant du vin.*

Les résultats correspondent à cinq périodes de 10 jours.

La première période se situe au début de la phase d'observation. Les animaux sont nourris à l'aide du régime équilibré et ils boivent de l'eau.

La seconde, la troisième et la quatrième périodes, se situent respectivement du 1^{er} au 10^e jour, du 62^e au 72^e jour et du 135^e au 145^e jours après la mise au vin.

Tous les animaux reçoivent encore un régime équilibré, mais l'eau est remplacée par le vin, sauf dans un lot témoin. A chaque vin A, B, C correspond un lot différent ainsi qu'on l'a vu plus haut.

La cinquième période s'étend du 211^e au 221^e jour après la mise au vin. Les conditions expérimentales sont les mêmes qu'au cours des trois périodes précédentes si ce n'est le régime qui n'est plus équilibré mais enrichi artificiellement en lipides.

Les résultats sont reportés sur le tableau 4. Les poids de nourriture qui y figurent ont été calculés de la même manière que pour l'établissement du tableau 3.

TABLEAU 4

Consommation pondérale moyenne en g. par animal et par jour

	1 ^{er} lot témoin eau	2 ^e lot vin A	3 ^e lot vin B	4 ^e lot vin C
Période d'observation régime équilibré sans vin.....	14,5	14,5	13,0	13,0
Période s'étendant du 1 ^{er} au 10 ^e jour après la mise au vin avec régime équilibré.....	13,0	10,5	10,0	10,0
Période s'étendant du 62 ^e au 72 ^e jour après la mise au vin avec régime équilibré.....	10,0	8,0	7,5	8,5
Période s'étendant du 135 ^e au 145 ^e jour après la mise au vin avec régime équilibré.....	12,0	10,0	8,5	9,5
Période s'étendant du 211 ^e au 221 ^e jour après la mise au vin avec régime hyperlipidique.....	10,5	10,0	8,0	8,5

L'examen de ce tableau montre que les animaux soumis à *un régime équilibré* et recevant comme boisson du vin, absorbent une quantité moindre d'aliments que les témoins buvant de l'eau. Il semble que ce soit le lot B qui ait consommé le moins de nourriture. Il y aurait donc une variation en fonction de la nature du vin.

Si on considère les animaux soumis ensuite au régime *hyperlipidique*, la quantité de nourriture ingérée diminue pour les témoins buvant de l'eau, alors qu'elle reste sensiblement identique chez les rats consommant du vin.

C. *Consommation de boisson*

La consommation d'eau a été mesurée seulement au départ de l'expérience pendant la période d'observation. Elle n'a pas été poursuivie ensuite sur le lot témoin.

Par contre, des mesures de consommation vin ont été faites sur les autres lots. On distingue quatre périodes :

— Pendant les première, deuxième et troisième périodes, s'étendant respectivement du 1^{er} au 10^e jour, du 62^e au 72^e jours et du 135^e au 145^e jour après la mise au vin, les animaux reçoivent un régime alimentaire équilibré et absorbent les vins A, B et C.

— La quatrième période, qui s'étend du 211^e au 221^e jours après la mise au vin, diffère des précédentes par la nature du régime alimentaire qui n'est plus équilibré mais enrichi en lipides.

TABEAU 5

Consommation de boisson par animal et par jour.

	Vin A	Vin B	Vin C	Eau
Période s'étendant du 1 ^{er} au 10 ^e jour après la mise au vin régime équilibré..	12,5	10,0	9,5	—
Période s'étendant du 62 ^e au 72 ^e jour après la mise au vin régime équilibré..	16,5	12,0	12,0	—
Période s'étendant du 135 ^e au 145 ^e jour après la mise au vin régime équilibré..	18,5	13,5	14,0	—
Période s'étendant du 211 ^e au 221 ^e jour après la mise au vin régime hyperlipidique	16,7	11,3	11,6	—
Période s'étendant du 300 ^e au 340 ^e jour après la mise au vin régime hyperlipidique	15,75	11,40	13,55	16,80

Étant donné l'influence des conditions climatiques sur la consommation de boisson, seule une comparaison entre les quantités des différents vins, consommés par chaque lot d'animaux pendant la même période, peut être significative ⁽¹⁾.

Le tableau 5 rend compte des résultats.

(1) Nous avons par ailleurs relevé l'évolution des principales conditions climatiques au cours de l'expérimentation.

Les quantités de vin, exprimées en millilitres, qui y figurent, représentent la moyenne rapportée à un animal et à une journée, du vin consommé par l'ensemble des animaux de chaque lot pendant toute la durée envisagée.

Avec le régime équilibré, la consommation de vin croît régulièrement pour atteindre une augmentation de 48 p. 100 dans le cas du vin A, 35 p. 100 dans le cas du vin B et 53 p. 100 dans le cas du vin C. A ce stade, la consommation du vin A est supérieure de 37 p. 100 environ à chacun des deux autres vins.

Le passage au régime hyperlipidique provoque dans tous les cas une diminution de cette consommation et est de l'ordre de 10 p. 100 pour le vin A et de 16 à 17 p. 100 pour les autres vins.

Quel que soit le régime, équilibré ou hyperlipidique, la consommation de vin A est toujours supérieure à celle des vins B et C. Le mode de vinification paraît donc avoir une influence très nette sur la quantité de vin consommée.

IV. — DISCUSSION ET CONCLUSIONS

On va discuter successivement :

- 1^o du comportement général des animaux en fonction des boissons ingérées ;
- 2^o de l'incidence de la boisson sur le taux de la ration alimentaire et du volume de liquide ingéré.

Nous rappelons que dans ces essais, il s'agit d'une autoalimentation, ration et breuvage étant laissés à la libre disposition de l'animal.

A. Comportement des animaux

L'eau alcoolisée est au départ mal tolérée au point qu'on note des troubles diarrhéiques d'autant plus graves que la ration est riche en lipides.

Au contraire, le remplacement de l'eau par le vin n'entraîne aucun trouble apparent quel que soit le régime.

Les troubles diarrhéiques sont supprimés en remplaçant la boisson eau alcoolisée par l'eau d'abord, puis par une dilution alcoolique très faible au départ portée progressivement à 7 p. 100, puis 11 p. 100, enfin 14 p. 100 qui était le titre de l'eau alcoolisée initialement ingérée.

Il y aurait donc une accoutumance de l'organisme. On peut donc se demander si débutant avec une eau alcoolisée à 7 p. 100 on aurait eu les troubles diarrhéiques constatés.

De toute façon, le comportement des vins et de la dilution alcoolique (les rattes ont reçu en moyenne par 24 h, 1,7 g d'éthanol) sont essentiellement différents car, en dehors des troubles diarrhéiques, on note un comportement général bien dissimilable : poils hérissés, maigreur, agitation dans le lot alcoolique, poil luisant, aspect normal dans les lots vins.

On retrouve ici la conclusion des auteurs cités en début du mémoire.

B. *Ration alimentaire*

L'influence de la boisson est d'autant plus significative qu'il y a simultanément augmentation de poids et diminution de la ration. Ce double effet est surtout marqué pour le vin A.

Avec les données du tableau 3 et pour le régime équilibré on peut calculer que si la ration est 100 pour le lot Témoin, elle devient 81 p. 100 pour le vin A, 74 p. 100 pour le vin B et 79 p. 100 pour le vin C. Remarquons la plus faible consommation dans le cas du vin B.

La variation de poids, toujours en régime équilibré, montre que si pour deux vins B et C, on note une différence avec le lot témoin, plus grande avec le vin C, par contre, pour le vin A, les courbes de croissance sont pratiquement superposables.

Ces animaux toujours soumis à ces mêmes régimes seront au moment du sacrifice systématiquement analysés en muscle, graisse, eau, pour les différentes parties du corps.

— D'une façon très générale, on peut dire que dans ces essais la consommation du vin a provoqué une économie de la ration alimentaire, spectaculaire avec le vin A, très nette avec le vin C. Quant au vin B, la courbe de croissance n'a pas la même allure.

Faut-il penser que le lot B au départ n'avait pas le même potentiel croissance que les autres lots? De toute façon, le poids initial était nettement plus faible.

Ce comportement différent des trois vins ne peut s'expliquer que par une composition différente en certains éléments constitutifs.

Nous ne croyons pas qu'il faille incriminer les éléments métalliques aussi bien le K que le Fe. Par contre, une différence essentielle apparaît avec les « matières tannoïdes » déterminées par la densité optique et l'indice de permanganate.

Les travaux de MASQUELIER et ses collaborateurs marquent bien la différence fondamentale entre deux constituants essentiels des « matières tannoïdes » des vins.

— D'une part, les leucoanthocyanes qu'il préférerait appeler leucotannoïdes par suite de leur rôle biologique. Ces substances sont les plus actives sur la résistance capillaire et constituent le facteur vitaminique P.

— D'autre part, des polyleucoanthocyanes ou tanins condensés sans action sur la résistance capillaire et que l'on appelle « antiviamine » P. MASQUELIER a même montré que cette substance est douée de toxicité.

Sur un autre plan les travaux du Pr MACCABIES de Montpellier donnent à l'acide malique un rôle métabolite dû à sa présence dans le cycle tricarboxylique ou cycle de Krebs.

Or, l'analyse quantitative révèle des doses apparemment différentes dans les trois vins essayés.

Quoi qu'il en soit, ces analyses ne sont pas suffisantes pour préciser la cause des différences de comportement notées entre ces trois vins qui, quels qu'ils soient, se distinguent de la dilution alcoolique. De toute façon, l'économie de ration par le vin et l'influence du mode de vinification sur le comportement des vins sont indiscutables. Ils confirment ce que l'un de nous avait déjà constaté en 1955 (FLANZY et *al.*, 1955).

Le fait nouveau, peut-on dire, est la variation du volume de liquide consommé. A ce sujet on note une certaine concordance entre les vins A et C et une consomma-

tion vers la fin de l'expérience plus faible pour le vin B. Ces différences doivent-elles être expliquées par une « préférence », donc par un effet essentiellement gustatif?

Quelle que soit l'explication qu'on puisse en donner, les rats au régime vin ont moins soif que les rats au régime eau.

Mais dans le régime Vin, nous constatons après une certaine période un accroissement du volume ingéré.

Cette croissance du volume de boisson, librement choisie, peut s'expliquer ou par un besoin physiologique ou par un plaisir psychosensoriel et peut-être par les deux à la fois. On peut dire dans le deuxième cas que le rat préfère dans l'ordre les vins A et C et légèrement au-dessous le vin B.

On peut également invoquer l'influence des conditions climatiques car la période d'expérience qui est marquée par les consommations de liquide et de nourriture correspond aux mois d'été.

Dans un autre sens on peut dire aussi que le vin B étant plus riche en certaines substances (polyphénol-azote), le rat en a exigé une quantité plus faible pour son équilibre nutritionnel.

Et pour le vin C, la présence, quoique faible, d'anhydride sulfureux, peut avoir une action sur le volume du vin consommé, ce fait ayant été signalé par MASQUELIER.

Comment expliquer la diminution du besoin boisson par passage au régime hyperlipidique? Un apport de lipides atténue-t-il le besoin de boire? Il nous est fort difficile de donner une explication. Retenons seulement cette action lipidique surtout nuisible avec le vin C.

En conclusion générale, on peut dire que vin et alcool ont une action essentiellement différente. Cette différence joue en faveur des vins qui, sur le plan nutritionnel, ont un effet bénéfique.

En particulier, dans ces essais, le vin a économisé sensiblement la ration alimentaire.

Reçu pour publication en avril 1965.

SUMMARY

CONTRIBUTION TO THE PHYSIOLOGICAL STUDY OF THE RELATIVE EFFECTS OF WINE AND ETHANOL. THE ROLE OF ALIMENTARY REGIMEN, THE IMPORTANCE OF THE METHOD OF VINIFICATION.

This memorandum, with regard to the nutritional observations, completes the results concerning the effects of alcohol on the vaginal cycle of the rat, this being the subject of a communication to the *Académie de Médecine*. After comparing wines of the same origin obtained by different techniques and vinification methods, the authors state that alcohol and wines behave very differently. They note a decrease in the alimentary ration due to the wines, which varied according to the wine; thus the previous results obtained by one of these authors in collaboration or by other researchers are confirmed.

The authors show moreover, with regard to the ingestion of wine, a decrease in the volume of drink freely ingested. Subsequently, an increase in this volume was noted.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ARON E., FLANZY M., COMBESCOT Ch., PUISAIS J., DEMARET J., REYNOUARD-BRAULT F., IGERT C., 1965. L'alcool est-il, dans le vin, l'élément qui perturbe, chez la ratte, le cycle vaginal? Note présentée le 16 février 1965 à l'Académie de Médecine.

- ASCHKENAZY-LELU M^{me}, 1958. Rapport sur l'activité du Haut Comité d'Étude et d'Information sur l'Alcoolisme, 26.
- COMBESCOT Ch., DEMARET J., N'GORE-KASSI F., TRÉMOLIÈRES J. Action de l'éthanol sur le cycle vaginal de la ratte ; rôle de l'alimentation. Note déposée à la Société de Biologie (*à paraître*).
- FLANZY M., CAUSERET J., 1952. Contribution à l'étude physiologique des boissons alcooliques. *Ann. Technol. agric.*, **1**, 227-240.
- FLANZY M., CAUSERET J., HUGOT M^{me} D., GUÉRILLOT M^{me} J., 1955. Contribution à l'étude des boissons alcooliques. II. Étude comparée de différents vins et de diverses techniques œnologiques. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 359-379.
- RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., MASQUELIER J., 1961. Le vin dans l'alimentation humaine in *Traité d'Œnologie*, **2**, 110.
- PRANDEL, 1930. Remarques sur les aliments, boissons, remèdes et poisons vivants et morts. *Bull. intern. Vin*, juillet.
- ROUGIE J.P., 1950. *Toxicité comparée du vin et de son eau-de-vie*. Thèse Bordeaux.

ÉTUDE DE LA RESPIRATION DE QUELQUES SUBSTRATS NON FERMENTESCIBLES PAR *SACCHAROMYCES* *CEREVISIAE* HANSEN

C. BIZEAU et P. GALZY

Avec la collaboration technique de M^{me} Émilienne BIZEAU, A. DI NOTO et C. PLAN

Laboratoire de Recherches de la Chaire de Génétique
Centre de Recherches agronomiques du Midi, Montpellier (Hérault)

SOMMAIRE

La respiration de l'éthanol, des acides L-lactique, D-lactique, pyruvique et acétique a été étudiée chez la levure. L'action de la concentration sur la vitesse de la respiration peut présenter plusieurs modalités.

L'une est obtenue quand le premier enzyme de la chaîne d'oxydation est un lyoenzyme et constitue le facteur limitant la vitesse de réaction. Dans ce cas, la loi d'action de la concentration sur la vitesse de la respiration dans la cellule intacte semble assez voisine de la loi d'action obtenue avec l'enzyme *in vitro*.

Si, au contraire, le premier enzyme est soluble et n'est pas le facteur limitant, la loi est très complexe.

Les enzymes mitochondriaux se comportent très différemment. Quand la chaîne d'oxydation est située entièrement dans la mitochondrie, la loi d'action de la concentration est la même, que le premier enzyme de la chaîne soit ou non le facteur limitant. Il est probable que dans ce cas, l'enzyme est intégré dans une structure organisée qui lui fait perdre une partie de son individualité.

I. — INTRODUCTION

La vitesse de respiration de l'acide L-lactique par la levure préalablement cultivée sur glucose, est limitée par le premier enzyme de la chaîne de dégradation : la L-LDH ⁽¹⁾. Cette vitesse mesurée au Warburg constitue une estimation de l'activité de l'enzyme dans la cellule (P., GALZY 1964). L'acide lactique pénétrant libre-

⁽¹⁾ Liste des abréviations : O P : Oxydase pyruvique ; D-LDH : D-lactico-déshydrogénase ; L-LDH : L-lactico-déshydrogénase ; A D H : alcool déshydrogénase ; A Co A K : Acétocoenzyme A kinase.

ment dans la cellule, il en résulte que les lois d'action de la concentration sur la vitesse de la respiration et sur l'activité de l'enzyme *in vitro* sont voisines.

Contrairement à l'exemple ci-dessus, l'action de la concentration sur la vitesse de respiration des acides D-lactique et pyruvique est complexe. Deux hypothèses ont été proposées (P., GALZY 1964). La courbe observée pourrait être simplement liée au fait que le premier enzyme de la chaîne d'oxydation n'en est pas le facteur limitant ; la vitesse de fonctionnement de la chaîne n'aurait alors qu'une relation indirecte et complexe avec la concentration. Mais cette courbe pourrait aussi s'expliquer par le fait que l'OP et la D-LDH sont situées dans les mitochondries alors que la L-LDH peut être considérée comme un lyoenzyme. La diffusion des substrats dans les mitochondries pourrait, par exemple, être en cause. Ce travail est destiné à discuter ces hypothèses.

II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

A. Matériel biologique

Les expériences ont été réalisées avec la souche diploïde n° 4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Les facteurs de croissance indispensables sont l'adénine, l'histidine, la biotine et l'acide pantothénique (P. GALZY, 1964).

B. Techniques de culture

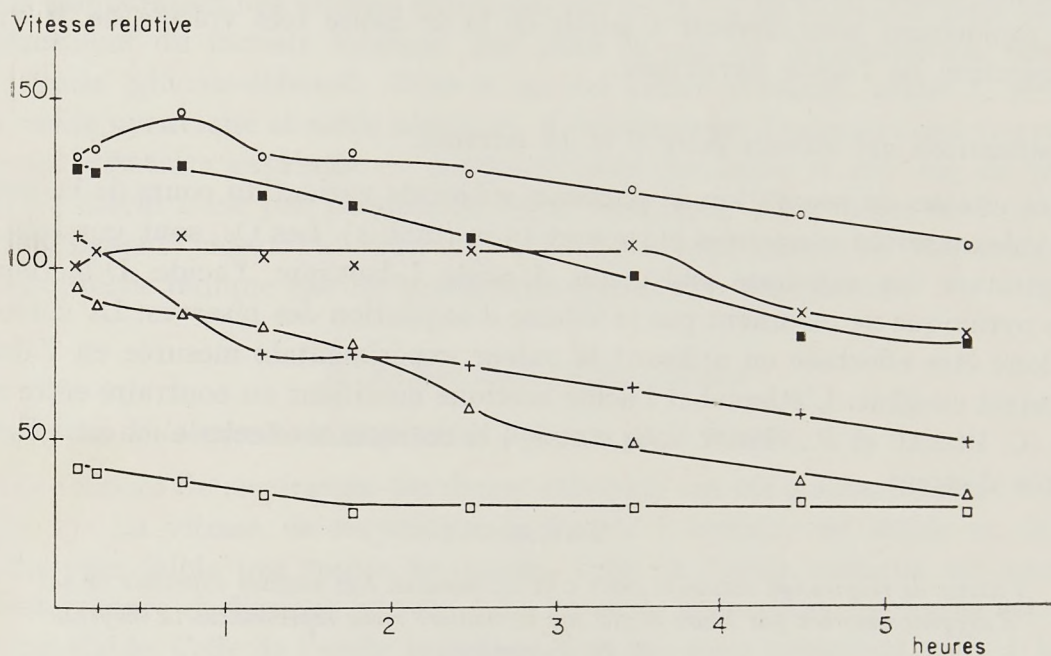
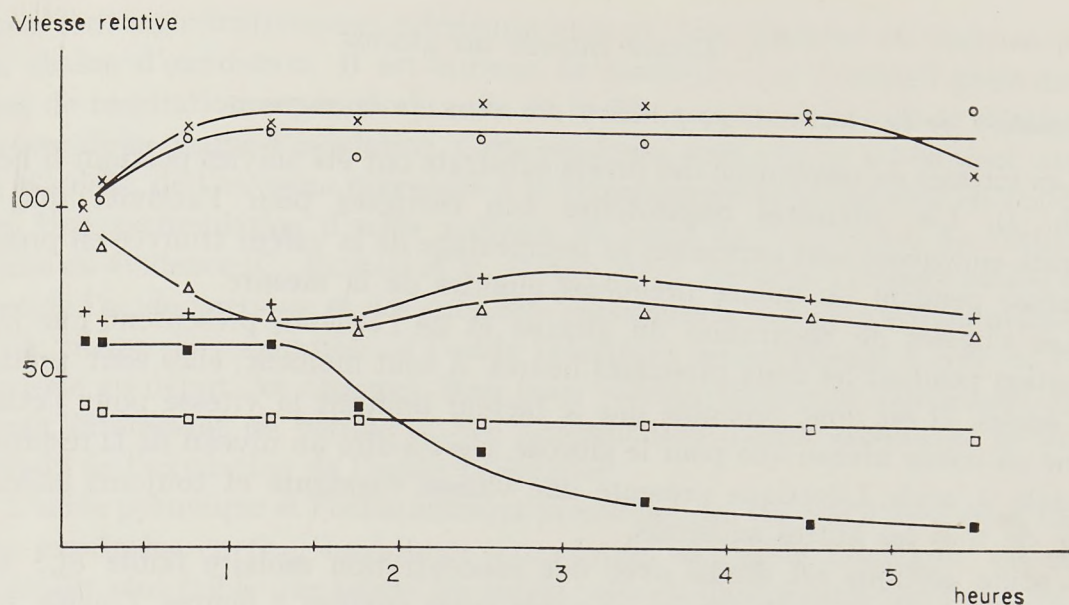
Les cultures ont été conduites sur le milieu synthétique G, décrit par ailleurs (GALZY et SLO-NIMSKI, 1957 a). La seule source de carbone est, selon le cas, du glucose ou de l'éthanol, à la dose de 2 p. 100. Les cultures sont effectuées à 25°C avec agitation (100 oscillations/minute, amplitude 5 cm), dans des erlenmeyers remplis au 1/10 de leur volume.

C. Étude de la respiration

Les mesures manométriques sont effectuées suivant la méthode directe de Warburg. La préparation des solutions utilisées pour ces déterminations a été décrite précédemment (P. GALZY, 1964).

III. — COMPARAISON DES VITESSES DE RESPIRATION DE QUELQUES SUBSTRATS

Les vitesses de respiration de l'éthanol, du glucose et des acides acétique, D-lactique, L-lactique et pyruvique ont été comparées en cultivant au préalable la levure soit sur glucose, soit sur éthanol. Dans tous les cas, la concentration utilisée pour la mesure est celle qui assure la vitesse maximum d'oxydation. Tous les substrats ont été étudiés simultanément sur une même suspension de levure dans une expérience déterminée. Dix expériences ont été effectuées après culture sur glucose et dix après culture sur éthanol. Chaque point des graphiques représente la moyenne de ces dix déterminations.



GRAPHIQUE 1. — Évolution de la vitesse de respiration de divers substrats au cours de la mesure.

Abscisse : temps exprimé en heures.

Ordonnée : vitesse de la respiration exprimée en pourcentage de la valeur trouvée en présence de glucose entre 0 et 15 minutes.

Les vitesses ne sont pas corrigées de l'activité due aux substrats endogènes. Chaque point représente la moyenne de 10 déterminations et exprime la vitesse mesurée dans des intervalles de 30 minutes entre 0 et 2 heures et d'une heure ensuite. La vitesse mesurée entre 0 et 15 minutes est également indiquée sur le graphique car elle sert de référence tout au long de ce travail.

Haut : levure cultivée sur glucose.

× glucose	27 mM
○ éthanol	190 mM
■ acide acétique	3,8 mM

+ acide pyruvique	76 mM
△ acide D-lactique	150 mM
□ acide L-lactique	38 mM

Bas : Levure cultivée sur éthanol.

× glucose	27 mM
○ éthanol	190 mM
■ acide acétique	38 mM

+ acide pyruvique	190 mM
△ acide D-lactique	380 mM
□ acide L-lactique	150 mM

A. *Levure cultivée sur glucose*1° *Évolution de la vitesse de respiration au cours de la mesure.*

Les vitesses de respiration des divers substrats ont été suivies pendant 6 heures (graph. 1). Les intensités respiratoires non corrigées pour l'activité due aux substrats endogènes sont exprimées en pourcentage de la valeur trouvée en présence de glucose pendant les quinze premières minutes de la mesure.

Les vitesses de respiration du glucose et de l'éthanol présentent une légère adaptation pendant les deux premières heures. A tout moment, elles sont pratiquement égales. Il est donc probable que le facteur limitant la vitesse pour l'éthanol se situe au même niveau que pour le glucose, c'est-à-dire au niveau de la respiration terminale. L'acide L-lactique présente une vitesse constante et toujours inférieure à celle de tous les autres substrats.

L'acide acétique est étudié avec une concentration molaire faible (3,8 mM), ce qui explique la chute de vitesse observée après environ 2 heures. L'acide pyruvique a une vitesse d'oxydation stable. La vitesse de respiration de l'acide D-lactique baisse rapidement pour devenir à partir de la 2^e heure très voisine de la vitesse de respiration de l'acide pyruvique.

2° *Comparaison des vitesses entre 0 et 15 minutes.*

Les vitesses de respiration de plusieurs substrats varient au cours de la mesure. Leurs valeurs seront comparées entre 0 et 15 m (tabl. 1). Les Q_{O_2} sont corrigés pour la respiration des substrats endogènes. L'acide L-lactique, l'acide D-lactique et l'acide pyruvique ne modifient pas la vitesse d'oxydation des réserves. La correction peut donc être effectuée en utilisant la valeur expérimentale mesurée en l'absence de substrat exogène. L'éthanol et l'acide acétique modifient au contraire cette respiration (C. BIZEAU et P., GALZY 1964 a et b) ; la correction effectuée ici est peut-être entachée d'erreur.

TABLEAU I

Vitesses de respiration mesurées entre 0 et 15 minutes. Les vitesses exprimées en μ l d'oxygène absorbés par heure et par mg de matière sèche représentent la moyenne de 10 déterminations

Substrats	Glucose	Éthanol	Acide D-Lactique	Acide pyruvique	Acide acétique	Acide L-Lactique
Croissance sur glucose	46	44	41	28	24	14
Croissance sur éthanol	72	98	61	79	96	26

La comparaison des vitesses de respiration a été effectuée par la méthode des couples. La vitesse de respiration de l'éthanol est égale à celle du glucose. Celle de l'acide D-lactique est inférieure aux deux précédentes, mais la différence n'est pas significative. Il n'est pas possible d'exclure l'hypothèse selon laquelle la respiration de l'acide D-lactique serait limitée par la respiration terminale. Toutes les autres

vitesses sont significativement inférieures et sont donc limitées en d'autres points de la chaîne d'oxydation. Il est curieux de constater que l'éthanol présente une vitesse de respiration supérieure à celle de l'acide acétique bien que ce dernier soit une étape de sa chaîne d'oxydation. Cette remarque reste valable si l'on tient compte, dans le calcul, de l'oxygène nécessaire à la transformation de l'éthanol en acide acétique. Une accumulation d'acide acétique au cours de l'oxydation de l'éthanol a été mise en évidence (C., BIZEAU et P., GALZY 1965). De plus, l'éthanol inhibe l'oxydation de l'acide acétique et des substrats endogènes à la concentration utilisée.

La vitesse de respiration de l'acide D-lactique est supérieure à celle de l'acide pyruvique au début des mesures. Mais leurs valeurs deviennent rapidement égales. Il serait intéressant de vérifier si une accumulation d'acide pyruvique se produit au début de l'oxydation de l'acide D-lactique.

L'acide pyruvique et l'acide acétique présentent des vitesses d'oxydation comparables exprimées en Q_{O_2} . La vitesse d'oxydation de l'acide L-lactique est significativement plus faible que toutes les autres ; elle est donc limitée par l'activité dans la cellule de la L-LDH.

La comparaison des vitesses exprimées par les Q_{O_2} n'est suffisante pour indiquer l'emplacement du facteur limitant que dans le cas où la respiration terminale est en cause (glucose-éthanol). Dans le cas des autres substrats (acides L- et D-lactique, acide pyruvique et acide acétique), il conviendrait d'estimer aussi l'oxydation réelle des substrats exprimée en micromolécules par heure et par mg de matière sèche. Ce calcul n'est pas possible de façon rigoureuse car le bilan de l'oxydation est difficilement mesurable dans ces conditions expérimentales. Cependant, un calcul approché indique que les conclusions émises sont acceptables.

B. *Levure cultivée sur éthanol*

1° *Évolution de la vitesse de respiration au cours de la mesure.*

Les vitesses de respiration des divers substrats ont été suivies pendant 6 heures (graph. 1). La vitesse de respiration de l'acide L-lactique est stable et demeure toujours plus faible que toutes les autres. Celle de l'acide acétique est constante pendant 1 heure et diminue ensuite. La vitesse de respiration du glucose est pratiquement stable. Celle de l'acide D-lactique diminue assez nettement après 2 heures. Enfin, la vitesse de respiration de l'acide pyruvique décroît tout au long de la mesure. L'éthanol présente une vitesse d'oxydation pratiquement stable pendant 6 heures.

2° *Comparaison des vitesses de respiration entre 0 et 15 minutes.*

La comparaison des vitesses de respiration des divers substrats par la levure préalablement cultivée sur éthanol a été effectuée entre 0 et 15 minutes. (tabl. 1).

L'éthanol et l'acide acétique présentent des vitesses comparables et significativement supérieures à toutes les autres. Il est permis de penser que ces vitesses sont limitées par la respiration terminale. L'éthanol est oxydé, à la concentration utilisée ici, avec accumulation d'acide acétique et avec un quotient respiratoire anormalement faible (C. BIZEAU et P., GALZY 1965). Il est probable que le DPNH formé au cours de la transformation de l'éthanol en acide acétique sature pratiquement la respiration terminale (cytochrome C et cytochrome oxydase).

La vitesse de respiration de l'acide L-lactique est significativement inférieure à toutes les autres. Elle reste donc limitée par l'activité de la L-LDH dans la cellule.

L'acide D-lactique a une vitesse inférieure à toutes les autres, sauf à celle de l'acide L-lactique. Il est probable que cette vitesse est limitée par l'activité de la D-LDH dans la cellule puisqu'elle est significativement inférieure à la vitesse d'oxydation de l'acide pyruvique. La vitesse de respiration de l'acide pyruvique étant elle-même inférieure à celle de l'acide acétique, semble limitée par l'activité de l'OP.

Le résultat le plus remarquable est que la vitesse de respiration du glucose se trouve être significativement inférieure à celles de l'éthanol et de l'acide acétique. Elle pourrait même être inférieure à celle de l'acide pyruvique. La vitesse de respiration du glucose n'est donc plus limitée par la respiration terminale. Elle ne l'est peut-être pas non plus au niveau du cycle de Krebs.

Il est difficile de comparer les valeurs absolues trouvées pour les Q_{O_2} lorsque la levure a été préalablement cultivée sur des substrats différents. En effet, le potentiel respiratoire de la levure varie beaucoup en fonction du stade de croissance de la levure. Ces variations au cours de la culture diffèrent selon le substrat utilisé pour la croissance (GALZY et SLONIMSKI, 1956 *a*). Cependant, il n'est pas sans intérêt d'effectuer la comparaison des vitesses de respiration après culture sur glucose ou sur éthanol.

La chaîne des oxydations cellulaires a été profondément modifiée par la culture sur éthanol. La vitesse de respiration de l'acide acétique est devenue égale à celle de l'éthanol. Ce phénomène pourrait être lié à l'induction du shunt glyoxylique comme VANDERWINKEL (1959) l'a observé après culture sur acide acétique. L'activité de l'A Co A K dans la cellule a également augmenté.

Les Q_{O_2} éthanol semblent plus élevés après culture sur éthanol qu'après culture sur glucose. Il est donc permis de penser que l'éthanol a induit une biosynthèse plus active de tous les enzymes de sa chaîne d'oxydation : respiration terminale, enzymes du cycle de Krebs, A Co A K. Cette augmentation d'activité des enzymes du cycle de Krebs explique certainement que la vitesse de respiration de l'acide pyruvique soit limitée par l'OP. Elle peut également expliquer que la vitesse d'oxydation de l'acide pyruvique paraisse légèrement plus élevée après culture sur éthanol qu'après culture sur glucose.

La vitesse de respiration du glucose n'est plus limitée par la respiration terminale. Cette observation peut être liée soit à une augmentation d'activité des enzymes de la respiration terminale, soit à une baisse d'activité des enzymes intervenant spécifiquement dans le métabolisme du glucose. Il ne fait pas de doute que la synthèse des enzymes de la respiration terminale est plus active après culture sur éthanol.

Les valeurs absolues des vitesses de respiration des acides L-lactique, D-lactique et pyruvique semblent avoir augmenté après culture sur éthanol. De plus, la vitesse de respiration de l'acide pyruvique est devenue plus rapide que celle de l'acide D-lactique. Il n'est donc pas possible d'exclure que l'OP, la L-LDH et la D-LDH aient subi une élévation de leur activité.

Les variations observées peuvent s'expliquer par la suppression de l'effet glucose ou par une adaptation induite par le substrat. Il est difficile de distinguer ces deux actions mais la comparaison de ces résultats avec ceux obtenus après culture sur acide DL-lactique (GALZY et SLONIMSKI, 1956 *b*) permet plusieurs conclusions. Dans les deux cas, les enzymes de la respiration terminale et certains enzymes du

cycle de Krebs augmentent d'activité. Il est également possible que de nombreux autres enzymes (L-LDH, D-LDH, OP, ADH) présentent une biosynthèse plus rapide. Cependant, la culture sur acide lactique provoque une élévation spectaculaire des vitesses de respiration des deux acides lactiques. Ces vitesses deviennent supérieures à celle du glucose alors qu'elles n'augmentent que légèrement après culture sur éthanol. La culture sur éthanol a une action très importante sur les vitesses de respiration de l'éthanol et de l'acide acétique. Le substrat a donc une action spécifique sur la formation des enzymes intervenant dans son métabolisme.

Le schéma suivant peut être proposé. L'oxygène constitue l'inducteur principal de la biosynthèse des enzymes respiratoires (SLONIMSKI 1953). Son action est plus marquée sur la respiration terminale. Les différents substrats des enzymes de la chaîne peuvent servir d'inducteurs secondaires. Ils agissent spécifiquement au niveau des premiers enzymes responsables de leur oxydation. Cette induction pourrait porter également sur le reste de leur chaîne d'oxydation. Ce schéma est conforme à l'hypothèse de l'adaptation des systèmes multienzymatiques (SLONIMSKI, 1953). L'action inhibitrice du glucose semble être très générale : respiration terminale, enzymes du cycle de Krebs, L-LDH, D-LDH, ADH, A Co A K. Il n'est pas possible de dire si cet effet pléiotrope du glucose s'exerce uniformément le long de la chaîne des oxydations cellulaires ou préférentiellement en certains points. En étudiant ces phénomènes au niveau enzymatique, M. SOMLO (1965) a montré la part qui revient à chacun des trois niveaux : oxygène, effet glucose, action inductrice des substrats.

IV. — ÉTUDE DES VARIATIONS DE LA VITESSE DE RESPIRATION EN FONCTION DE LA CONCENTRATION EN SUBSTRAT

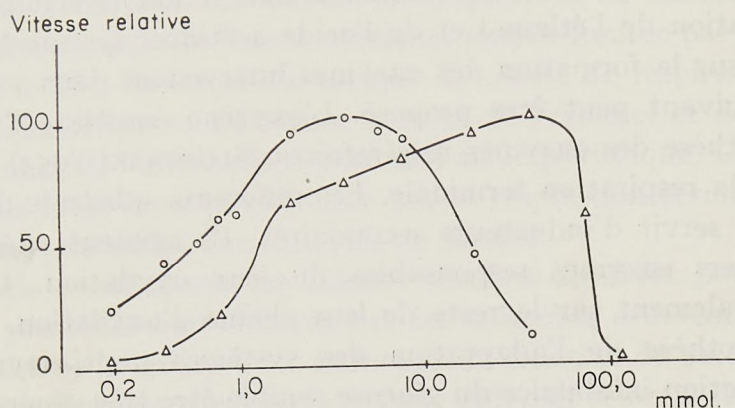
La détermination de la concentration assurant la vitesse maximum d'oxydation des divers substrats a été indispensable pour la réalisation des expériences décrites au paragraphe 3. Les variations de ces vitesses en fonction de la concentration ont dû être étudiées systématiquement. Ces résultats vont être exposés ici et permettront de répondre à la question posée dans l'introduction. Pour l'établissement de ces courbes expérimentales, tous les calculs ont été effectués sur des vitesses corrigées pour la respiration des réserves mesurées en l'absence de substrat exogène. Dans chaque expérience, les résultats ont été exprimés en pourcentage de la vitesse maximum obtenue pour la concentration saturante. Les points expérimentaux représentent la moyenne de 10 expériences, sauf indications contraires.

A. *Acide acétique*

L'évolution de la vitesse de respiration de l'acide acétique en fonction de la concentration est représentée sur le graphique 2.

Dans le cas de la levure cultivée sur glucose, l'acide acétique inhibe fortement sa propre oxydation aux concentrations supérieures à 3,8 mM. Aux concentrations inférieures, la courbe est voisine de celle que pourrait donner une réaction enzymatique. Ce point de vue est confirmé par un ajustement selon LINEWEAVER et

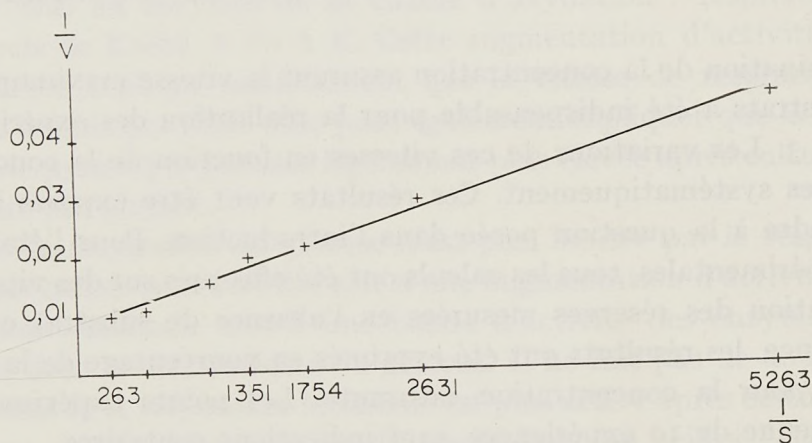
BURK (graph. 3). La constante de demi-saturation mesurée sur ce graphique est 0,94 mM. Il est possible cependant que cette valeur ne corresponde pas à un enzyme défini. La constante de MICHAELIS de l'A Co A K de la levure n'est pas connue. Il conviendra d'en effectuer la mesure pour interpréter ces résultats de façon définitive.



GRAPHIQUE 2. — Évolution de la vitesse de respiration de l'acide acétique en fonction de la concentration
En abscisse : concentration molaire représentée avec une échelle logarithmique.
En ordonnée : Vitesse relative de la respiration de l'acide acétique exprimée en pourcentage de la vitesse maximum.

○ Levure cultivée sur glucose.
△ Levure cultivée sur éthanol.

Dans le cas de la levure cultivée sur éthanol, l'inhibition ne commence qu'aux concentrations supérieures à 38 mM et devient extrêmement brutale. Entre les concentrations 3,8 mM et 38 mM, la vitesse augmente légèrement avec la concentration. La culture sur éthanol provoque donc une élévation de la concentration



GRAPHIQUE 3. — Action de la concentration en substrat sur la vitesse de respiration de l'acide acétique
Ajustement des résultats expérimentaux suivant le système de représentation de LINEWEAVER et BURK.
La levure a été cultivée sur glucose.

En abscisse : inverse de la concentration molaire en acide acétique.
En ordonnée : inverse de la vitesse de respiration.

saturante qui est multipliée par un facteur 10. Entre les concentrations 0,19 et 3,8 mM la courbe obtenue après culture sur éthanol n'est pas sans analogie avec celle obtenue après culture sur glucose. L'ajustement selon LINEWEAVER et BURK a été effectué pour cette zone de concentration ; la courbe obtenue n'est pas une droite. L'action

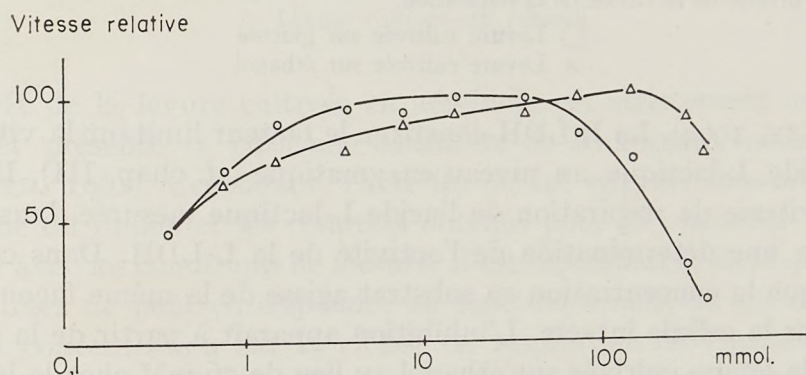
de la concentration sur la vitesse de respiration de l'acide acétique chez la levure cultivée sur éthanol ne suit pas une loi correspondant à une réaction enzymatique simple.

Avant de discuter ces résultats, il convient de rappeler que l'acide acétique stimule l'oxydation des substrats endogènes aux concentrations comprises entre 0,19 et 3,8 mM. Il peut donc en résulter une légère erreur sur la détermination de la vitesse de respiration de l'acide acétique. Cette erreur est cependant trop faible pour modifier la loi d'action de la concentration bien qu'elle ne soit pas constante aux divers points de la courbe.

L'acide acétique pénètre librement dans les cellules de levures d'après CONWAY et DOWNEY (1950). Le premier enzyme de sa chaîne de dégradation, l'A Co A K, est un enzyme soluble (VANDERWINKEL, 1960). Il est remarquable que la loi d'action de la concentration sur la vitesse de respiration de ce substrat suive une cinétique de réaction enzymatique dans les cellules cultivées sur glucose. Bien que le K_m de l'enzyme ne soit pas connu, il est permis de penser que la courbe expérimentale représente une image du fonctionnement de l'enzyme dans la cellule. Les résultats du paragraphe 3 ne permettent pas d'affirmer que l'A Co A K est le facteur limitant la vitesse d'oxydation de l'acide acétique au niveau enzymatique. Cependant, cette hypothèse est très vraisemblable. Après culture sur éthanol, le facteur limitant la vitesse de respiration de ce substrat a changé. Il est situé au niveau de la respiration terminale. La courbe ne suit plus les lois des réactions enzymatiques.

B. Acide L-lactique

L'action de la concentration sur la vitesse de respiration de l'acide L-lactique par la souche 4 préalablement cultivée sur glucose 0,5 p. 100 a fait l'objet d'une publication antérieure (P. GALZY, 1964). Le graphique 4 indique les résultats obtenus avec la même souche cultivée sur glucose 2 p. 100. La vitesse maximum est obtenue



GRAPHIQUE 4. — Évolution de la vitesse de respiration de l'acide L-lactique en fonction de la concentration

En abscisse : Concentration molaire représentée avec une échelle logarithmique.

En ordonnée : Vitesse relative de la respiration de l'acide L-lactique exprimée en pourcentage de la vitesse maximum.

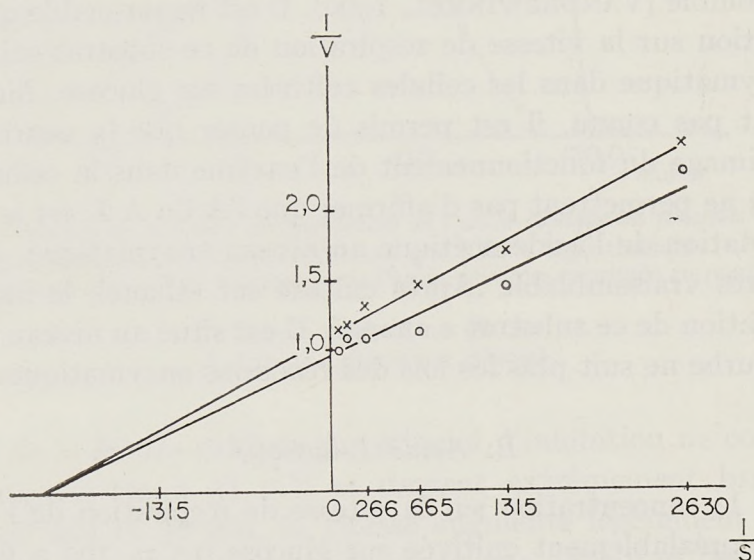
○ Levure cultivée sur glucose

△ Levure cultivée sur éthanol

pour les concentrations comprises entre 15 et 38 mM. La loi d'action de la concentration sur la vitesse de respiration de l'acide L-lactique est représentée par une courbe très voisine de celle que donnerait *in vitro* la L-LDH. L'inhibition observée aux concentrations supérieures à 76 mM pourrait être liée à l'inhibition de la L-

LDH par un excès de son substrat (HASEGAWA, 1962). L'ajustement selon le système de représentation de LINEWEAVER et BURK donne une droite (graph. 5) entre les concentrations 0,38 et 15 mM. L'extrapolation graphique permet d'estimer la constante de demi-saturation qui est de 0,45 mM. Cette valeur est très voisine de la constante de MICHAELIS de la L-LDH.

La culture sur éthanol a modifié quelques aspects secondaires de la courbe d'action de la concentration (graph. 4). Aux faibles concentrations (0,38 à 15 mM), la courbe suit une loi correspondant à une réaction enzymatique. L'ajustement selon LINEWEAVER et BURK donne une droite (graphique 5) ; la constante de demi-saturation est 0,45 mM. Cette courbe semble donc encore correspondre au fonctionnement de la L-LDH. L'acide lactique pénètre probablement librement dans la cellule de



GRAPHIQUE 5. — Action de la concentration en substrat sur la vitesse de respiration de l'acide L-lactique
Ajustement des résultats expérimentaux suivant le système de représentation de LINEWEAVER et BURK.
En abscisse : inverse de la concentration molaire en acide L-lactique.
En ordonnée : inverse de la vitesse de la respiration.

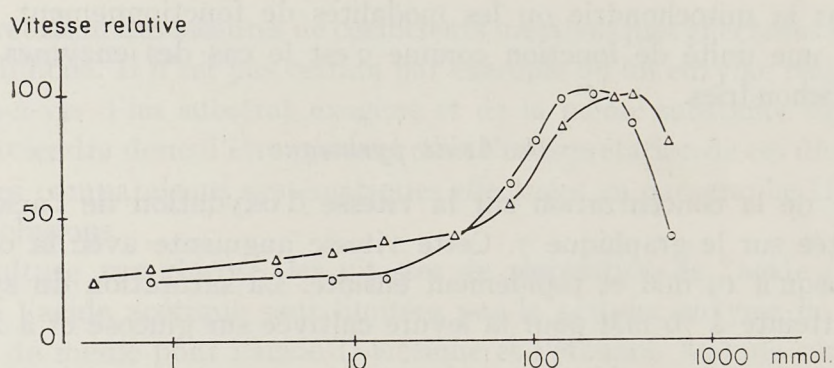
○ Levure cultivée sur glucose
× Levure cultivée sur éthanol

levure (P. GALZY, 1964). La L-LDH constitue le facteur limitant la vitesse de respiration de l'acide L-lactique au niveau enzymatique (cf. chap. III). Il est donc probable que la vitesse de respiration de l'acide L-lactique mesurée dans la cellule intacte constitue une détermination de l'activité de la L-LDH. Dans ces conditions, il est normal que la concentration en substrat agisse de la même façon sur l'enzyme *in vitro* et dans la cellule intacte. L'inhibition apparaît à partir de la concentration 300 mM chez la levure cultivée sur éthanol au lieu de 76 mM chez la levure cultivée sur glucose. Dans les concentrations comprises entre 15 et 150 mM, la vitesse de respiration augmente très légèrement. Cette élévation de la vitesse est significative bien qu'assez faible. La place du facteur limitant la vitesse d'oxydation de l'acide L-lactique n'a pas changé. La vitesse maximum obtenue après culture sur éthanol est supérieure à celle qui est obtenue après culture sur glucose. Cette différence de vitesse traduit une augmentation de la quantité d'enzyme. Une telle augmentation ne peut suffire à expliquer une résistance supérieure à l'action inhibitrice d'un excès de substrat. La culture sur éthanol semble avoir provoqué l'apparition d'un mécanisme protecteur de la chaîne des oxydations cellulaires. Pour l'acide

acétique et pour l'acide L-lactique, il semble qu'un même phénomène se produise. La concentration de ces substrats assurant une inhibition de la chaîne des oxydations cellulaires est plus élevée après culture sur éthanol qu'après culture sur glucose.

C. Acide D-lactique

L'action de la concentration sur la vitesse d'oxydation de l'acide D-lactique est représentée sur le graphique 6. Aux faibles concentrations, la vitesse n'augmente que lentement avec la concentration. L'augmentation devient très rapide à partir d'une concentration voisine de 38 mM. La vitesse maximum est atteinte pour la concentration 150 mM dans le cas de la levure cultivée sur glucose et 380 mM dans le cas de la levure cultivée sur éthanol. Enfin, une inhibition apparaît aux concentrations supérieures à 300 mM chez la levure cultivée sur glucose et 380 mM chez la levure cultivée sur éthanol.



GRAPHIQUE 6. — Action de la concentration en substrat sur la vitesse de respiration de l'acide D-lactique

En abscisse : concentration molaire représentée avec une échelle logarithmique.

En ordonnée : vitesse relative de la respiration de l'acide D-lactique, exprimée en pourcentage de la vitesse maximum.

Chaque point expérimental représente la moyenne de 4 déterminations.

- Levure cultivée sur glucose
- △ Levure cultivée sur éthanol

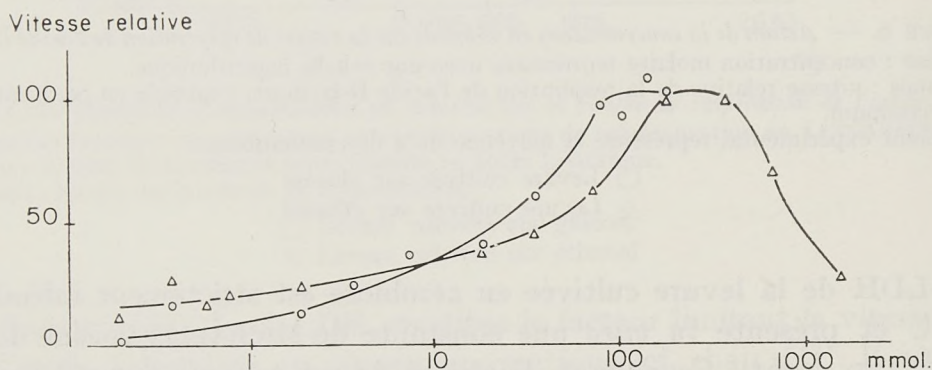
La D-LDH de la levure cultivée en aérobiose est strictement inféodée au cytochrome C et présente *in vitro* une constante de MICHAELIS voisine de 0,05 mM (A. P. NIGAARD, 1961). Cependant, l'activité de cet enzyme dépend beaucoup de la force ionique du milieu et les résultats obtenus pour la constante de MICHAELIS peuvent varier avec les conditions de mesure. Il est cependant évident que la deuxième partie des courbes ne peut correspondre au fonctionnement de cet enzyme. La loi d'action de la concentration sur la vitesse de respiration de l'acide D-lactique ne ressemble pas à une courbe enzymatique. L'ajustement selon le système de représentation de LINEWEAVER et BURK entre les concentrations 15 et 150 mM pour les levures cultivées sur glucose et entre 38 et 380 mM pour les levures cultivées sur éthanol ne donne pas une droite. La seule différence observée après culture sur glucose et après culture sur éthanol semble être une translation de la courbe d'action de la concentration vers des concentrations plus élevées. En effet, la concentration saturante passe de 150 mM à 380 mM et l'inhibition commence au-dessus de 380 mM au lieu de 300 mM.

Il convient de rappeler que le facteur limitant la vitesse de respiration de l'acide D-lactique est la D-LDH pour la levure cultivée sur éthanol. Ce n'est pas le

cas pour la levure cultivée sur glucose. La place du facteur limitant la vitesse n'a pas d'influence sur la loi d'action de la concentration dans le cas de l'acide D-lactique. Il est donc certain que la loi observée n'est pas liée au fait que le facteur limitant la vitesse n'est pas le premier enzyme de la chaîne de dégradation. Cette hypothèse qui avait été précédemment émise (P. GALZY, 1964) ne peut pas expliquer les observations effectuées avec la levure cultivée sur éthanol. Les lois d'action de la concentration sur la vitesse de respiration des acides L-lactique et D-lactique sont très différentes. La première suit une courbe de réaction enzymatique alors que la seconde est très complexe. Or, chez la levure préalablement cultivée sur éthanol, les deux chaînes d'oxydation sont limitées par leur premier enzyme. Les deux substrats semblent pénétrer par la même voie dans la cellule. Il semble que le comportement différent de la chaîne d'oxydation de l'acide D-lactique ne puisse s'expliquer que par la présence dans la mitochondrie de la D-LDH. Il n'est naturellement pas possible de déterminer ici si le phénomène en cause est la diffusion physique du substrat dans la mitochondrie ou les modalités de fonctionnement d'un enzyme intégré dans une unité de fonction comme c'est le cas des enzymes respiratoires dans les mitochondries.

D. Acide pyruvique

L'action de la concentration sur la vitesse d'oxydation de l'acide pyruvique est représentée sur le graphique 7. Cette vitesse augmente avec la concentration, lentement jusqu'à 19 mM et rapidement ensuite. La saturation du système respiratoire est atteinte à 76 mM pour la levure cultivée sur glucose et à 190 mM pour



GRAPHIQUE 7. — Action de la concentration en substrat sur la vitesse de respiration de l'acide pyruvique
 En abscisse : concentration molaire représentée avec une échelle logarithmique.
 En ordonnée : vitesse relative de la respiration de l'acide pyruvique, exprimée en pourcentage de la vitesse maximum.
 Chaque point expérimental représente la moyenne de 4 déterminations.

○ Levure cultivée sur glucose
 △ Levure cultivée sur éthanol

la levure cultivée sur éthanol. Dans ce dernier cas, des concentrations beaucoup plus élevées ont été étudiées. Une inhibition apparaît aux concentrations supérieures à 380 mM. L'acide pyruvique et l'acide D-lactique inhibent donc la chaîne de leur oxydation à partir de la même concentration chez la levure cultivée sur éthanol.

La constante de MICHAELIS de l'OP est égale à 0,1 mM (ALVAREZ VANDERWINKEL et WIAME, 1958). La décarboxylase pyruvique qui est un lyoenzyme pourrait intervenir également mais elle est moins liée au métabolisme respiratoire que l'OP. La constante de MICHAELIS est 1 mM (HOLZER et *al*, 1956; HOLZER et

GOEDDE, 1957; HOLZER, 1961). Les courbes expérimentales ne peuvent donc correspondre au fonctionnement de ces enzymes puisque les zones où les vitesses augmentent rapidement commencent à 19 mM.

Le facteur limitant la vitesse de la respiration de l'acide pyruvique au niveau enzymatique n'est pas connu chez la levure cultivée sur glucose. L'OP est au contraire le facteur limitant dans le cas de la levure cultivée sur éthanol. Or, les courbes obtenues sont très voisines. La loi observée n'est donc pas liée au fait que le premier enzyme de la chaîne de dégradation n'est pas le facteur limitant. Elle pourrait s'expliquer par la présence dans les mitochondries de l'OP qui constitue probablement le premier maillon de la chaîne.

DISCUSSION ET CONCLUSION

L'interprétation des mesures de coefficients métaboliques effectuées sur les cellules intactes est difficile. Il n'est pas certain par exemple qu'un enzyme réagisse de façon identique vis-à-vis d'un substrat exogène et de la même substance formée dans la cellule. Il conviendra donc d'être prudent dans l'interprétation de ces divers résultats. Cependant, les comparaisons systématiques effectuées au paragraphe III permettent plusieurs conclusions.

Après culture sur glucose, les vitesses de respiration de l'acide L-lactique et, peut-être, de l'acide acétique sont limitées par le premier enzyme de la chaîne. Il n'en est pas de même pour l'acide D-lactique et l'éthanol. Aucune conclusion n'est possible pour l'acide pyruvique.

Après culture sur éthanol, les vitesses de respiration sont limitées par le premier enzyme de la chaîne d'oxydation pour l'acide L-lactique, l'acide D-lactique et l'acide pyruvique. La respiration de l'acide acétique est au contraire très rapide et pourrait être limitée par la respiration terminale.

La culture sur éthanol semble avoir provoqué des modifications du métabolisme qui ne s'expliquent peut-être pas en faisant intervenir uniquement des différences dans la biosynthèse des enzymes. En effet, l'inhibition de l'oxydation de l'acide acétique par un excès de substrat ne se manifeste après culture sur éthanol qu'à la concentration 38 mM au lieu de 3,8 mM. Le même phénomène se retrouve pour l'acide L-lactique. Dans ce cas, l'inhibition apparaît à partir de la concentration 300 mM après culture sur éthanol au lieu de 76 mM après culture sur glucose. Par ailleurs, l'éthanol 190 mM inhibe certaines étapes de la chaîne des oxydations cellulaires (C. BIZEAU et P. GALZY, 1954 c). Cette inhibition est nettement moins marquée chez la levure cultivée sur éthanol que chez la levure cultivée sur glucose. Aucune explication de ces observations n'apparaît. Il semble que la culture sur éthanol ait fait apparaître dans les cellules de levure des mécanismes protecteurs du fonctionnement de la chaîne des oxydations cellulaires.

La discussion des hypothèses émises dans l'introduction exige la comparaison des courbes d'action de la concentration sur la vitesse de respiration dans quatre cas :

1° Le premier enzyme de la chaîne d'oxydation est un lyoenzyme et constitue le facteur limitant la vitesse.

2° Le premier enzyme est un loenzyme mais ne constitue pas le facteur limitant.

3° Le premier enzyme est mitochondrial et constitue le facteur limitant la vitesse.

4° Le premier enzyme est mitochondrial et ne constitue pas le facteur limitant.

Les résultats qui ont été exposés au paragraphe IV peuvent se répartir entre ces divers cas.

La première catégorie est représentée par la respiration de l'acide L-lactique par la levure cultivée sur glucose ou sur éthanol, et, probablement aussi, par la respiration de l'acide acétique par la levure cultivée sur glucose. La loi d'action de la concentration rappelle celle d'une réaction enzymatique *in vitro*. Il semble que les propriétés d'un enzyme comme la L-LDH sont identiques dans la cellule et *in vitro*. Cette observation permet de supposer que les substrats étudiés ici pénètrent pratiquement librement dans la cellule, ce qui est conforme aux résultats antérieurs (P. GALZY, 1964 ; CONWAY et DOWNEY, 1949).

Le premier enzyme de la chaîne n'est plus le facteur limitant la vitesse dans le cas de la respiration de l'acide acétique par la levure cultivée sur éthanol. La loi d'action de la concentration devient très complexe. Elle correspond probablement à la résultante d'équilibres complexes dans la chaîne des réactions.

Le premier enzyme est mitochondrial et constitue le facteur limitant la vitesse dans le cas de l'acide pyruvique (OP) et de l'acide D-lactique (D-LDH) chez la levure préalablement cultivée sur éthanol. Les lois d'action de la concentration sur la vitesse sont cependant très complexes. Les deux courbes obtenues sont assez voisines. Il est donc permis de penser que la loi d'action de la concentration est liée à la présence dans la mitochondrie du premier enzyme de la chaîne d'oxydation.

Le premier enzyme mitochondrial n'est pas le facteur limitant la vitesse de respiration de l'acide pyruvique et de l'acide D-lactique chez la levure cultivée sur glucose. Les deux courbes d'action de la concentration sur la vitesse sont voisines. Elles sont également voisines des courbes obtenues avec la levure préalablement cultivée sur éthanol. Ce fait confirme bien les conclusions précédentes.

La loi d'action de la concentration sur la vitesse de respiration de l'acide D-lactique et de l'acide pyruvique est nécessairement liée à la présence du premier enzyme dans la mitochondrie. Il semble donc qu'une différence fondamentale existe entre le fonctionnement des lyoenzymes et celui des enzymes mitochondriaux. La courbe expérimentale obtenue avec les acides D-lactique et pyruvique rappelle, au point de vue formel, la courbe théorique correspondant à l'hypothèse selon laquelle la vitesse de respiration serait limitée par la diffusion dans les mitochondries (P. GALZY, 1964). L'établissement de l'équation correspondante comporte de nombreuses approximations. Le parallélisme relatif des courbes expérimentales et théoriques ne constitue pas de toute façon une preuve de l'intervention de la diffusion.

D'ailleurs, il ne faut pas perdre de vue que les enzymes respiratoires semblent groupés dans la mitochondrie en unités de fonction bien individualisées (LEHNINGER, 1964). Les courbes expérimentales observées dans le cas où le premier enzyme de la chaîne est mitochondrial pourraient être le résultat de l'intégration de l'enzyme dans un système organisé. Chaque enzyme aurait perdu en partie son individualité dans ces structures alors que les lyoenzymes pourraient avoir gardé dans la cellule un comportement relativement autonome.

Cette hypothèse expliquerait que les lyoenzymes se comportent de façon très voisine dans la cellule et *in vitro*. Les enzymes mitochondriaux se comportent de façon fondamentalement différente.

Reçu pour publication en avril 1965.

SUMMARY

STUDY OF THE RESPIRATION OF SOME SUBSTRATES NON-FERMENTESCIBLE BY «SACCHAROMYCES CEREVISIAE» HANSEN

The effect on concentration on the rate of respiration of a substrate by the intact cell can follow several modalities. If the first enzyme of the oxidation chain is a lyoenzyme and constitutes the rate-limiting factor, the effect of concentration is near that of the enzyme *in vitro*. This is the case for L-Lactic acid and perhaps for acetic acid in yeast cultivated in glucose. If the first enzyme is a lyoenzyme but does not constitute the rate-limiting factor, the effect depends upon complex equilibria.

The oxidation chains situated entirely in the mitochondria present a very different behaviour. The effect of concentration in the case where the first enzyme of the chain is mitochondrial is very different from the preceding. None of the properties of the enzyme *in vitro* is found in the intact cell, even if this enzyme constitutes the limiting factor.

These conclusions are based on the study of substrates which freely permeate the cell.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ALVAREZ A., VANDERWINKEL E., WIAME J. N., 1958. L'oxydation de l'acide pyruvique chez la levure. *Bioch. Biophys. Acta*, **28**, 333.
- BIZEAU C., GALZY P., 1964 a. Bilan de l'oxydation de l'éthanol par *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *C. R. Acad. Sci.*, **258**, n° 21, 5280-5282.
- BIZEAU C., GALZY P., 1964 b. Bilan de l'oxydation de l'acide acétique par *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *C. R. Soc. Biol.*, sous presse.
- BIZEAU C., GALZY P., 1965. Observation sur le fonctionnement de la chaîne d'oxydation de l'éthanol chez *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. *C. R. Soc. Biol.* (à paraître).
- CONWAY E. J., DOWNEY M., 1949. An outer metabolic region of the yeast cell. *Biochem. J.*, n° 47, 347-355.
- GALZY P., 1964. Étude génétique et physiologique du métabolisme de l'acide lactique chez *Saccharomyces cerevisiae* HANSEN. Thèse de Doctorat d'Etat *Ann. Technol. agric. I. N. R. A.*, **13**, 109-259.
- GALZY P., SLONIMSKI P. P., 1957 a. Variations physiologiques de la levure au cours de la croissance sur l'acide lactique comme seule source de carbone. *C. R. Acad. Sci.*, **245**, 2423.
- GALZY P., SLONIMSKI P. P., 1957 b. Évolution de la constitution enzymatique de la levure cultivée sur acide lactique ou sur glucose comme seule source de carbone. *C. R. Acad. Sci.*, **245**, 2556.
- HASEGAWA H., 1962. On some Properties of yeast L + lactate deshydrogenase. *J. Biochem.*, **52**, 1, 12-15.
- HOLZER H., 1961. Regulation of carbohydrate metabolism by enzyme competition. *Cold Spring Harbor Symp. quantitative biology*, **26**, 277-288.
- HOLZER H., GOEDDE H. W., 1957. Zwei wege von pyruvat zu acetylcoenzym a him hefe. *Biochem. Z.*, **329**, 175-191.
- HOLZER H., SCHULTZ G., VILLAR C., PALASI, JUNGEL-SELL J., 1956. Isolierung der hefecarboxylase und untersuchungen über die aktivität des enzymes in lebenden Zellen. *Biochem. Z.*, 327-331.
- LEHNINGER A. L., 1964. The transfert of energy in oxidative phosphorylation. *Cinquantenaire Société de Chimie biologique*, 25-45.
- NIGAARD A. P., 1961. D (—) lactic cytochrome C reductase, a flavoprotein from yeast. *J. Biol. Chem.*, **236**, 3, 920.
- SLONIMSKI P. P., 1953. *Formation des enzymes respiratoires chez la levure*, Masson éd., Paris.
- SOMLO M., 1965. Induction des lactico-cytochrome C réductase (D et L) de la levure aérobie par les lactates (D et L). *Biochem. Biophys. Acta*, sous presse.
- VANDERWINKEL E., 1960. Le métabolisme oxydatif chez *Saccharomyces cerevisiae*, Thèse, Université libre de Bruxelles.

SUR LA COMPOSITION CHIMIQUE DE QUELQUES VARIÉTÉS DE PIMENTS DOUX

M. SOUTY et P. ANDRÉ

*Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches agronomiques du Sud-Est, Montfavet (Vaucluse)*

SOMMAIRE

Au cours des deux récoltes de 1963 et 1964, les auteurs ont étudié la composition sucres-acidité et vitamine C de quelques variétés de piments doux. Ils ont constaté que, lors de la maturation, l'acidité totale s'accroît notablement.

INTRODUCTION

Les travaux de SZENT-GYORGI, en 1934, montrèrent la richesse en vitamine C du Piment et cet auteur put identifier l'acide hexuronique isolé des surrénales à l'acide ascorbique isolé de ce végétal.

GENEVOIS et coll. (1940) ont dosé, sur une quinzaine de variétés de piments cultivés en divers endroits, la vitamine C, les substances réductrices qui l'accompagnent, les vitamines B₁, B₂, les acides organiques.

Ils ont montré que les piments doux ou paprika constituent une intéressante source de vitamine C, notamment dans les régions méditerranéennes.

Industriellement, les piments secs présentent un intérêt supplémentaire : réduits en poudre, ils sont utilisés pour colorer les aliments déshydratés : potages, sauces.

Certains pays (Espagne en particulier) procèdent à l'extraction, à l'aide de solvants, des carotènes et xanthophyles de cette poudre, et c'est le produit obtenu qui est utilisé pour donner la coloration désirée à divers produits alimentaires :

potages, sauces ;
produits dérivés du lait.

Ce produit est également utilisé comme complément dans la nourriture des volailles pour améliorer la coloration de la chair des poulets et des jaunes d'œufs.

Les piments doux sont actuellement l'objet d'un programme de sélection par la Station d'Amélioration des Plantes maraîchères du C. R. A. du Sud-Est et, à la demande de E. POCHARD, nous avons entrepris dès 1963 l'étude de la composition chimique de quelques-unes des variétés qu'il étudie.

Par les études que nous envisageons, nous pensons :

— permettre une sélection des variétés en fonction de leur teneur en vitamine C, en acides organiques et sucres ;

— étudier les problèmes que pose la fabrication de la poudre de piment, et notamment, déterminer dans quelles proportions la vitamine C peut préserver cette poudre, ou les substances dans lesquelles elle est ajoutée, de l'oxydation ;

— étudier les matières colorantes du piment et de la poudre.

Au cours des récoltes de 1963 et 1964, nous avons effectué la première partie de ce programme, en dosant sur diverses variétés de piments :

sucres,
acides,
vitamine C.

Les piments doux verts, non mûrs, sont consommés, le plus souvent, à l'état cru dans nos régions, et les piments rouges, mûrs, principalement sous forme de poudre ou après cuisson.

Leur composition : sucres, acides et vitamine C, présente donc un intérêt indiscutable.

Pour chiffrer l'intérêt de la poudre de piment en matière de coloration, nous avons desséché, dans les mêmes conditions :

1 lot de piments *Niora*,
1 lot de tomates *Roma*.

Après séchage, les deux lots ont été pulvérisés et nous avons mesuré la couleur de chacune des deux poudres à l'aide d'un réflectomètre.

La longueur d'onde dominante était identique (590 m μ) pour les deux produits mais le facteur de pureté de la poudre obtenue à partir du piment était de 83 p. 100 alors qu'elle n'était que de 49 p. 100 pour la tomate *Roma*.

Rappelons que la tomate *Roma* est la variété classique de tomates utilisées pour la fabrication de poudres ou de concentrés.

Cette expérience montre donc l'intérêt de la poudre de piment pour la coloration de divers produits alimentaires.

ÉTUDES RÉALISÉES

Avant d'entreprendre l'étude des problèmes que pose la fabrication de la poudre, nous avons étudié la composition chimique du fruit frais et, étant donné les utilisations du fruit vert et du fruit mûr, nous avons analysé les deux sortes de fruits de la même variété.

Les fruits verts considérés avaient atteint leur développement normal et ne se différenciaient des fruits mûrs que par leur couleur.

— Nous avons déterminé l'acidité totale des broyats au moyen de soude N/20 et l'avons exprimée ensuite en acide malique afin de pouvoir effectuer le rapport $\frac{\text{sucre totaux.}}{\text{acidité}}$.

— Nous avons dosé les sucres par la méthode Bertrand avant et après inversion afin d'obtenir séparément le saccharose.

— Les extraits secs ont été déterminés à l'aide de l'étuve multicellulaire Chopin.

— Nous avons dosé la vitamine C selon la méthode de Roe et Esterling utilisée par A. OURNAC (1953).

Cette méthode, que nous avons comparée à la méthode de décoloration du dichlorophénol indophénol, est rapide, simple et spécifique.

Le mode opératoire que nous avons suivi est le suivant :

1° Extraction de l'acide ascorbique

Après broyage des fruits dans un mixer, on prend 10 g de la purée obtenue qu'on épuise plusieurs fois par de l'acide métaphosphorique à 5 p. 100 par centrifugation et on amène le volume à 200 ml.

2° Oxydation en acide déhydroascorbique

On prend 5 ml de la solution d'extraction que l'on dilue à 50 ml avec de l'acide métaphosphorique à 5 p. 100 puis, sur cette dilution, on fait agir du brome pur dont l'excès est éliminé par un courant d'air, et on filtre. Une partie aliquote de ce filtrat (10 ml) est additionnée du même volume d'une solution de thiourée à 1 p. 100 dans l'acide métaphosphorique à 5 p. 100 pour éliminer les dernières traces de brome.

3° Formation de l'osazone

On utilise deux tubes à essais bouchés émeri dans chacun desquels on pipette 4 ml ; l'un servira de témoin, l'autre est additionné de 1 ml de solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine (à 2 p. 100 dans l'acide suflurique 9N). Les deux tubes sont placés trois heures dans un bain-marie à $37^{\circ} \pm 0,5^{\circ}$.

4° Développement de la couleur

Les deux tubes sont ensuite plongés dans de la glace et on y introduit 5 ml d'acide sulfurique à 85 p. 100 afin de solubiliser le précipité d'hydrazone formé. On ajoute alors dans le tube témoin 1 ml de la solution de dinitrophénylhydrazine, puis les deux tubes sont retirés de la glace et abandonnés à la température ambiante.

5° Mesure de la couleur

Nous avons utilisé un Spectrophotomètre Beckman DU. Les lectures ont été effectuées à 530 m μ , dix minutes après la sortie du bain de glace pour les témoins, trente minutes après pour les essais. Il est nécessaire de tracer préalablement une courbe d'étalonnage au moyen d'une gamme de concentrations connues en acide ascorbique pur.

RÉSULTATS

Dans le tableau 1, nous rapportons les analyses effectuées au cours de la saison 1963 sur des piments non mûrs et mûrs.

Le tableau 2 est relatif à des variétés cultivées en serres en 1964 et uniquement des fruits mûrs.

Le tableau 3 se rapporte à des analyses effectuées sur la variété *Yolo-Wonder* et le tableau 4 à la variété *Antibois*. Ces deux variétés étaient cultivées en plein champ et nous avons analysé des fruits en train de virer et que nous désignons par le terme « marron ».

TABLEAU I

Analyse de piments verts et de piments mûrs de la récolte 1963

Les chiffres droits sont les résultats en p. 100 de matière fraîche
 Les chiffres en italique sont les résultats en p. 100 de matière sèche

Variétés	Couleur	Extrait sec	Acidité totale		Sucres totaux	Sucres réducteurs	Saccharose	Sucres totaux Acidité
			en méq.	en acide malique				
<i>Quadrato Giallo d'Asti (13-9-63)</i>	Verts	7,4	1,00 <i>13,50</i>	0,134 <i>1,810</i>	3,82 <i>51,70</i>	3,36 <i>45,46</i>	0,44 <i>5,95</i>	28,56
	Jaunes	9,4	1,20 <i>12,80</i>	0,161 <i>1,710</i>	5,16 <i>54,95</i>	4,59 <i>48,90</i>	0,54 <i>5,75</i>	32,13
<i>Doux d'Alger (17-9-63)</i>	Verts	7,15	0,70 <i>9,72</i>	0,094 <i>1,300</i>	3,83 <i>53,14</i>	2,61 <i>31,25</i>	1,16 <i>16,04</i>	40,87
	Rouges	8,90	1,40 <i>15,74</i>	0,188 <i>2,110</i>	5,62 <i>63,63</i>	4,79 <i>53,99</i>	0,81 <i>9,15</i>	30,15
<i>Antibois (28-9-63)</i>	Verts	8,35	1,00 <i>11,95</i>	0,134 <i>1,580</i>	3,75 <i>44,83</i>	2,75 <i>32,85</i>	0,94 <i>11,31</i>	28,37
	Rouges	9,45	1,60 <i>17,00</i>	0,214 <i>2,280</i>	5,20 <i>55,15</i>	4,65 <i>49,45</i>	0,50 <i>5,30</i>	24,19
<i>Yolo-Wonder (29-9-63)</i>	Verts	7,55	0,70 <i>9,23</i>	0,094 <i>1,240</i>	3,13 <i>41,40</i>	2,30 <i>30,50</i>	0,78 <i>10,32</i>	33,29
	Rouges	9,90	1,60 <i>16,11</i>	0,214 <i>2,160</i>	4,95 <i>49,93</i>	3,97 <i>40,08</i>	0,93 <i>9,40</i>	23,12

TABLEAU 2

Analyse de piments mûrs de la récolte 1964

Les chiffres droits sont les résultats en p. 100 de matière fraîche
 Les chiffres en italique sont les résultats en p. 100 de matière sèche

Variétés	Extrait sec	Acidité totale		Sucres totaux	Sucres réducteurs	Saccharose	Vitamine C	Sucres totaux Acidité
		en méq.	en acide malique					
<i>Calwonder</i>	9,44	4,10 <i>38,68</i>	0,61 <i>5,18</i>	6,36 <i>60,07</i>	6,20 <i>58,55</i>	0,15 <i>1,36</i>		11,6
<i>Lagnes</i>	8,17	4,96 <i>40,51</i>	0,66 <i>5,43</i>	8,05 <i>65,78</i>	7,81 <i>63,79</i>	0,22 <i>1,81</i>	0,237 <i>1,940</i>	12,11
<i>Yolo-Wonder</i>	10,24	3,13 <i>32,09</i>	0,42 <i>4,30</i>	5,62 <i>57,53</i>	5,55 <i>56,81</i>	0,06 <i>0,90</i>	0,149 <i>1,530</i>	13,38
<i>Gros Carré jaune</i>	8,92	2,54 <i>22,67</i>	0,34 <i>3,04</i>	7,44 <i>66,39</i>	6,43 <i>57,32</i>	0,96 <i>8,61</i>	0,298 <i>2,660</i>	21,84
<i>Vinedale</i>	7,92				7,27 <i>57,58</i>		0,267 <i>2,120</i>	

TABLEAU 3

Variété Yolo-Wonder

Les chiffres droits sont les résultats en p. 100 de matière fraîche
Les chiffres en italique sont les résultats en p. 100 de matière sèche

Date cueillette	Couleur	Extrait sec	Acidité totale		Sucres totaux	Sucres réduc- teurs	Saccha- rose	Vitamine C	Sucres totaux Acidité
			en méq.	en acide malique					
20-8-64	Verts	7,6	0,52 <i>6,84</i>	0,069 <i>0,916</i>	2,20 <i>28,95</i>	2,13 <i>28,03</i>	0,07 <i>0,92</i>	0,097 <i>1,276</i>	31,60
	Rouges	12,0	1,86 <i>15,50</i>	0,249 <i>2,077</i>	4,74 <i>39,50</i>	4,43 <i>36,92</i>	0,29 <i>2,42</i>	0,139 <i>1,158</i>	19,02
2-9-64	Verts	6,9	0,52 <i>7,53</i>	0,069 <i>1,009</i>	2,54 <i>36,81</i>	2,27 <i>32,90</i>	0,25 <i>3,71</i>	0,100 <i>1,449</i>	36,81
	Marrons	8,8	1,16 <i>13,18</i>	0,155 <i>1,766</i>	4,28 <i>48,64</i>	3,54 <i>40,23</i>	0,70 <i>7,99</i>	0,122 <i>1,386</i>	27,61
	Rouges	9,6	2,90 <i>30,20</i>	0,389 <i>4,047</i>	4,54 <i>47,29</i>	4,41 <i>45,94</i>	0,12 <i>1,28</i>	0,144 <i>1,500</i>	11,67
15-9-64	Verts	7,0	0,52 <i>7,43</i>	0,069 <i>0,995</i>	2,36 <i>33,71</i>	2,31 <i>33,00</i>	0,04 <i>0,67</i>	0,068 <i>0,971</i>	34,20
	Marrons	8,9	1,84 <i>20,67</i>	0,246 <i>2,770</i>	4,82 <i>54,16</i>	3,69 <i>41,46</i>	1,02 <i>2,56</i>	0,153 <i>1,719</i>	19,59
	Rouges	10,0	2,90 <i>29,00</i>	0,389 <i>3,886</i>	4,82 <i>48,20</i>	4,68 <i>46,80</i>	0,12 <i>1,20</i>	0,140 <i>1,400</i>	12,39

TABLEAU 4

Variété Antibois

Les chiffres droits expriment les résultats en p. 100 de matière fraîche
Les chiffres en italique expriment les résultats en p. 100 de matière sèche

Date cueillette	Couleur	Extrait sec	Acidité totale		Sucres totaux	Sucres réduc- teurs	Saccha- rose	Vitamine C	Sucres totaux Acidité
			en méq.	en acide malique					
18-8-64	Verts	8,3	0,83 <i>10,00</i>	0,111 <i>1,340</i>	2,88 <i>34,70</i>	2,68 <i>32,29</i>	0,19 <i>2,29</i>	0,173 <i>2,084</i>	25,89
	Rouges	9,5	2,28 <i>24,00</i>	0,305 <i>3,220</i>	4,68 <i>49,26</i>	4,62 <i>48,63</i>	0,06 <i>0,60</i>	0,177 <i>1,863</i>	15,30
8-9-64	Verts	7,8	0,62 <i>7,95</i>	0,083 <i>1,065</i>	3,17 <i>40,64</i>	2,61 <i>34,46</i>	0,53 <i>6,82</i>	0,139 <i>1,782</i>	38,16
	Marrons	9,6	2,26 <i>23,54</i>	0,303 <i>3,154</i>	5,10 <i>53,12</i>	4,68 <i>48,75</i>	0,41 <i>4,15</i>	0,174 <i>1,813</i>	16,84
	Rouges	9,8	3,20 <i>32,65</i>	0,429 <i>4,375</i>	5,22 <i>53,26</i>	4,88 <i>49,79</i>	0,32 <i>3,30</i>	0,183 <i>1,867</i>	12,17
4-6-9-64	Verts	7,7	0,62 <i>8,05</i>	0,083 <i>1,078</i>	2,68 <i>34,81</i>	2,68 <i>34,81</i>	0 <i>0</i>	0,128 <i>1,662</i>	32,29
	Marrons	8,8	1,44 <i>16,36</i>	0,193 <i>2,192</i>	4,34 <i>49,32</i>	4,18 <i>47,50</i>	0,15 <i>1,73</i>	0,173 <i>1,966</i>	22,50
	Rouges	9,1	2,90 <i>31,87</i>	0,389 <i>4,270</i>	4,82 <i>52,97</i>	4,76 <i>52,31</i>	0,05 <i>0,63</i>	0,174 <i>1,912</i>	12,41

DISCUSSION

Les deux premières variétés du tableau 1 sont des piments doux jaunes, le piment *Antibois* est une variété rouge locale, la variété *Yolo-Wonder* est une variété américaine, rouge également.

Les analyses effectuées font apparaître, dans tous les cas, une augmentation sensible de l'acidité de titration alors que l'accroissement, relativement faible, du taux des sucres fait apparaître, pour les variétés *Antibois*, *Yolo-Wonder* et *Doux d'Alger*, un rapport $\frac{\text{sucres}}{\text{acidité}}$ plus faible pour les piments mûrs que pour les piments verts. Dans le cas du piment *Quadrato Giallo d'Asti*, ce rapport est légèrement plus élevé dans le fruit mûr que dans le fruit vert.

Le tableau 2 montre que le fruit le moins acide est celui qui a la plus forte teneur en vitamine C. C'est également celui qui possède la plus grande quantité de sucres totaux et surtout, celui qui semble contenir le plus de saccharose. Cette constatation se confirme d'ailleurs de façon très nette lors de la dégustation, les piments de cette variété ayant un goût sucré très marqué. Cette variété *Gros Carré Jaune* est d'ailleurs très voisine de la variété *Quadrato Giallo d'Asti* du tableau 1.

Les tableaux 3 et 4 indiquent un accroissement notable de l'acidité de titration du piment vert au piment rouge, l'écart maximal correspondant à 83 mg/100 g de fruit frais dans le cas du piment vert et 429 mg/100 g dans le cas du piment rouge (exprimé en acide malique), soit 2,58 méq.

Le dosage des sucres totaux et des sucres réducteurs permet de conclure à un faible pourcentage des sucres non réducteurs tels que le saccharose.

Le dosage de la vitamine C met en évidence des différences variétales assez sensibles notées déjà par GENEVOIS sur les piments, et par de nombreux auteurs sur la plupart des fruits, et notamment, par TAVERNIER et JACQUIN (1955) sur les pommes et les poires, par PEYNAUD et GENEVOIS (1947) sur les pêches, les prunes, etc.

CONCLUSION

L'augmentation d'acidité au cours de la maturation est donc un phénomène constant constaté pour diverses variétés de piments, à deux récoltes différentes.

Il y a là un phénomène intéressant que nous préciserons dans un prochain travail en utilisant les dosages d'acides par chromatographie sur silice et sur résine.

Cette évolution est d'autant plus intéressante à préciser, qu'une acidité totale élevée peut être un obstacle à la consommation à l'état frais ou à son utilisation industrielle.

Nous constatons de plus que le piment vert, tel qu'on le consomme la plupart du temps, contient déjà des doses appréciables de vitamine C et ces travaux confirment bien l'intérêt de ce végétal puisque 100 g du fruit frais suffisent largement, à fournir la ration d'entretien quotidienne de l'homme.

SUMMARY

ON THE CHEMICAL COMPOSITION OF SOME SWEET PEPPERS VARIETIES

Sweet peppers are both an edible and an industrial vegetable : reduction to powder and utilisation of the colouring matter.

In view of carrying out a selection of the varieties we studied the composition in sugars, total acidity and vitamin C of the varieties grown by the *Station d'Amélioration des Plantes maraîchères du Centre de Recherches agronomiques du Sud-Est*

We noted the high content of vitamin C and important varietal differences.

We also noted a considerable increase of the total acidity when the pepper ripens. The determination by chromatography of the organic acids in this vegetable is being carried out to try and give an explanation to the reasons of this increase.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- GENEVOIS L., GATET L. (Mlle), FLAVIER H., 1940. Recherches biochimiques sur les piments. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **22**, 315.
- GENEVOIS L., PEYNAUD E., 1947. Composition de 16 variétés de pêches et composition de 9 variétés de prunes. *Rev. Hort.*, **30**, 17, 295-298 ; 28, 317-318.
- OURNAC A., 1953. Recherches sur la variation de la teneur en acide ascorbique et en facteur P du jus de raisin en fonction de son mode de préparation. *Ann. Technol. agric.* **11**, 99-111.
- TAVERNIER J., JACQUIN J., 1955. Qualité des pommes et des poires en fonction des variétés. *Ann. Nutr. Alim.*, **9**, 143-171.
-

CHRONIQUE DES LIVRES

MICROBIAL INHIBITORS IN FOOD. IVTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON FOOD MICROBIOLOGY. THE ACTION, USE AND NATURAL OCCURRENCE OF MICROBIAL INHIBITORS IN FOODS. Göteborg, June 1964. Uppsala, Almqvist and Wiksell, 1964, 402 p.

Cet ouvrage est constitué par les communications présentées au 4^e Symposium international de Microbiologie alimentaire tenu à Göteborg (Suède) en juin 1964.

Elles couvrent presque tous les produits antibactériens utilisés ou présentant un intérêt pour la conservation des aliments. Les organisateurs ont par contre délibérément exclu ce qui concerne le chlorure de sodium, les nitrates et nitrites, ainsi que les substances actives qui ne sont pas bien caractérisées chimiquement.

Par la bibliographie donnée après chaque article, il est possible de faire rapidement le point de nos connaissances actuelles sur les différents antibactériens.

J. M.

IRWING (G. W.), HOOVER (S. R.), *id.* — FOOD QUALITY. EFFECT OF PRODUCTION PRACTICES AND PROCESSING. — A symposium presented at the Philadelphia meeting of the American Association for the Advancement of Science, 26-29 December 1962. Washington, Amer. Assoc. Advanc. Sci., Publ. n° 77, 1965, 298 p.

Ce symposium, tenu en 1962 à Philadelphie, a couvert un domaine scientifique important, et qui s'est développé rapidement au cours de ces dernières années, celui de la production, de la protection et de la préparation de produits alimentaires de valeur nutritive élevée et de bonne présentation.

Chacune des cinq sections : Fruits et Légumes, Céréales, Produits laitiers, Volaille et œufs, Viandes, contient les rapports présentés par divers spécialistes (généticiens, agronomes, entomologistes, pathologistes, ingénieurs-chimistes ou physiciens) sur les divers aspects de cette production.

M. L. C.

RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 27, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles séparées seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

Au début de chaque mémoire, on indiquera : — *le titre du mémoire* : il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement*, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

Les mémoires seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :

a) *sommaire* : résumé suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction*, dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires que pour le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusion* ; f) *résumé* destiné à être traduit en anglais comportant une analyse complète de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds, les dons... ; h) *références bibliographiques*.

Les travaux originaux en anglais doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français très complet placé en tête de l'article. Les figures, graphiques, tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

Pour les autres documents (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

Les références bibliographiques doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (DUPONT et DUVAL, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné, suivi de : et al. A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

Pour les articles : le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) ; le titre du périodique en abrégé selon la World List of Scientific Periodicals, ou le Bulletin Signalétique du C. N. R. S. ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

Pour les ouvrages : le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés, et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part. Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit.

Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur feuille séparée, et porter les numéros des figures.

Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils seront envoyés à l'état de projets, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : soit × 0,5, soit × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des Annales est : 19 × 12,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées

Photographies : Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos 9 × 12, 4 photos 9 × 5,5, 6 photos 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur feuilles séparées et porter les numéros des figures.

Correction des épreuves : les auteurs recevront deux épreuves à corriger. Les corrections « d'auteur » ne sont autorisées que sur le premier jeu d'épreuves.

Envoi du manuscrit : M. FLANZY, Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude) France, ou M. MOCQUOT, Station centrale de Technologie des Produits animaux, Jouy-en-Josas. Seine-et-Oise). Envoyer deux exemplaires.

Le Directeur-Gérant : M. L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 25-9-1965.

Dépôt légal : 3^e trimestre 1965. N° d'impression : 1878

**ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE**

VOLUME 14

1965

NUMÉRO 4

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

149, rue de Grenelle - PARIS-7^e

ANNALES
DE
TECHNOLOGIE
AGRICOLE

VOLUME 14 1962 NUMÉRO 4

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des
auteurs et de l'Institut national de la Recherche agronomique,
à l'exception des sommaires et résumés.

ÉTUDE DES COMPOSÉS AZOTÉS DU VIN

D. TERCELJ

Institut agricole de Slovénie, Ljubljana

SOMMAIRE

Nous avons étudié :

a) Certains composés azotés, en particulier les acides aminés libres dans le moût, le moût fermenté et le vin afin de connaître le bilan de ces composés ;

b) L'influence de la filtration du moût sur la teneur du vin en ces composés azotés.

Pour obtenir la stabilisation biologique du vin doux et semi-doux de Slovénie, nous avons étudié l'influence des composés azotés sur le développement des levures du vin. La stabilisation des vins par l'appauvrissement biologique du vin en composés azotés est déjà depuis longtemps utilisée dans la production de l'*Asti Spumanti*.

INTRODUCTION

Différents auteurs ont étudié les composés azotés du vin, en particulier MUTH et MALSCH, (1934), PEYNAUD, (1936), RIBÉREAU-GAYON et PEYNAUD (1939), HENNIG (1943), PEYNAUD et MAURIE (1958), et LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD (1961).

BOURDET et HÉRARD concluent à la suite des travaux des différents auteurs que la somme des diverses fractions azotées (N-aminé, N-amidé, N-NH₃, N-polypeptidique et N-protéique) constituent 50-60 p. 100 d'azote total, 1/3 de l'N serait de composition inconnue. Leurs expériences montrent que les vins rouges et blancs de consommation courante présentent une composition azotée relativement simple dans laquelle les acides aminés libres constituent 90-91 p. 100 de N-total, les amides 6-9 p. 100, l'ammoniaque et le reste de l'azote non protéique (protéidique) 0,7-3,3 p. 100. LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD, en revanche, trouvent que les acides aminés libres ne représentent qu'une faible proportion de l'azote organique et non la presque totalité comme cela a été indiqué par BOURDET et HÉRARD.

HÉRARD et BOURDET (1958) identifient les bases puriques et pyrimidiques à l'état de traces, mais ne trouvent ni nucléosides, ni nucléotides.

Diverses méthodes ont été utilisées pour l'analyse des acides aminés libres :

— *Méthode de Sørensen par formoltitration.* BOURDET et HÉRARD constatent que les résultats d'azote aminé obtenus par formoltitration sont nettement inférieurs à ceux obtenus par chromatographie. La méthode ne permet pas de doser la totalité des constituants aminés du vin.

— *La méthode de Van Slyke à l'acide nitreux* donne des résultats supérieurs. Les observations de SISAKIAN et OPARIN montrent que les teneurs en acides aminés obtenues par cette méthode sont beaucoup trop faibles (OPARIN, 1/2). En effet, la méthode ne dose pas la proline (MICHEL, 1959).

— *La méthode de dosage de l'azote α -aminé par la ninhydrine* à l'aide de la méthode de CONWAY (1957) (MICHEL, 1959), donne des résultats trop faibles parce qu'on ne dose ni la proline, ni la β -alanine, ni le groupement guanidyl de l'arginine.

— *La somme des acides aminés* déterminée après séparation chromatographique paraît être la meilleure (BOURDET et HÉRARD). La plupart des auteurs ont séparé les acides aminés libres par chromatographie sur papier, CASTOR et ARCHER (1956) ont utilisé la chromatographie sur colonne.

— *Les méthodes microbiologiques.* Pour LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD, cette méthode dose les acides aminés libres et les petits peptides. Les résultats obtenus sont trop élevés. Les méthodes microbiologiques ont été utilisées par CASTOR (1953), LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD (1961), C. POUX, C. FLANZY et M. FLANZY (1964).

Les méthodes de fractionnement des acides aminés par chromatographie sur papier, soit unidimensionnelles, soit bidimensionnelles qualitatives ont été utilisées par SISAKIAN et BEZINGER (1949-1953), VALAIZE et DUPONT (1951), LUTHI et WETSCH, (1952), DUPONT (1953) TARANTOLA, (1954) DIMOTAKIS, (1955) PROCOPIO et CALE (1955), J. CARLES, M. LAMAZOU-BETBEDER, R. PECH (1958), H. WEISS A. ROUSSET, R. BONNET (1959) et H. WEISS et *al.* (1960).

La méthode bidimensionnelle quantitative a été utilisée par BIDAN et ANDRÉ (1958), BOURDET et HÉRARD (1958), KISKOVSKI (1963), DRAWERT (1963).

La formation des acides aminés au cours de la maturation a été étudiée par LAFON-LAFOURCADE et GUIMBERTEAU (1962), et DRAWERT (1963), BOURDET et HÉRARD (1958), ont étudié l'influence de l'autolyse des levures. LAFON-LAFOURCADE et PEYNAUD en 1962 ont travaillé la nutrition azotée des levures et en 1961 la composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification. Enfin, C., POUX C FLANZY et M., FLANZY (1964) ont étudié la formation de l'azote, surtout des acides aminés libres dans les vins au cours de la protéolyse.

A. — MATÉRIEL

Nous avons analysé les vins suivants :

1° *Vin « Gévêor »*, vin doux, commercial, 10 p. 100 d'alcool et 2 p. 100 de sucre.

2° *Moût de raisin* (de cépage *Servant* avec 17 p. 100 de sucre). Le raisin était traité par nous-même.

3° *Moût fermenté.* Le moût utilisé pour 2° a été laissé à la température ambiante pendant une semaine pour fermentation. Trois jours après il a été filtré pour séparer le vin des lies.

4° *Vin I Sauvignon de Slovénie* (ORMOZ-LJUTOMER), vin d'un an deux fois soutiré, de composition suivante :

Alcool : 11,24 p. 100 ou	88,7 g/l
Sucres réducteurs	3,2 g/l
Extrait sec	27,5 g/l
Acidité totale (en acide tartrique) ..	10,7 g/l
pH	3,1

5° *Vin II Sauvignon de Slovénie* (ORMOZ-LJUTOMER), ce vin est identique au vin I. Le moût a été filtré une fois sur Kielsegur au cours de la fermentation pour éliminer des levures ; cependant, ces levures se sont de nouveau développées. Le but de la filtration était d'appauvrir le moût en substances azotées. Le moût a été soutiré deux fois pendant l'année.

6° *Vin III Sauvignon de Slovénie* (ORMOZ-LJUTOMER). Ce vin est identique aux vins I et II, mais filtré deux fois au cours de la fermentation. Après fermentation, le vin était deux fois soutiré.

Le vin I a fermenté trois semaines, le vin II un mois et demi, le vin III deux mois. Nous avons soutiré une première fois, deux mois après la fermentation, une deuxième fois au mois de juin,

B. — MÉTHODES

Nous avons déterminé :

- l'N total par la méthode de Kjeldahl ;
- l'ammoniaque par distillation directe en milieu alcalin ;
- l'azote aminé par la méthode de dosage des acides aminés après séparation par chromatographie sur papier (FAUCONNEAU et PION, 1959).

Par cette méthode sont dosés les acides aminés libre et amides de l'extrait alcoolique et, d'autre part, après hydrolyse, les acides aminés du résidu de cet extrait.

1° *Acides aminés libres et amides*

La méthode ne sépare pas la leucine, l'isoleucine et la phénylalanine et mal l'histidine et l'arginine.

Pour séparer les acides aminés basiques, arginine et histidine, nous avons utilisé la chromatographie unidimensionnelle à l'aide du solvant butanol-acide acétique-eau.

Pour la séparation de la leucine, l'isoleucine et la phénylalanine nous avons utilisé la méthode de WOLFE, 1957.

En effectuant le bilan de l'azote de l'extrait alcoolique nous avons prouvé qu'il y a plus d'azote total dans cet extrait que dans les acides aminés dosés. Parmi ces composés azotés inconnus, on peut supposer qu'il s'agit de petites peptides.

Pour identifier certains acides aminés on a aussi utilisé quelques réactions spécifiques :

a) *Réaction de Toennis* (BLOCK R., 1958), spécifique pour les acides aminés soufrés : cystine, cystéine, méthionine, méthionine-sulfone, méthionine sulfoxyde qui donnent des spots blancs sur fond rouge.

Nous avons trouvé des spots blancs sur les vins I, II et III à côté de la proline 0,86-0,32) et au nord-est de la lysine (Rf 0,12-0,23 : cystine et cystéine). Le vin « Gévér » n'a pas donné de réaction. Les vins I, II et III contiennent des traces de cystine et de méthionine-sulfoxyde, qu'il est très difficile de doser à l'aide de la ninhydrine.

b) *Réaction de Pauly* (BLOCK R., 1958), spécifique pour déterminer le noyau imidazol (histidine ou peptides contenant le noyau imidazol). Le réactif donne des taches rouges sur fond jaune.

En pulvérisant les chromatogrammes, nous avons trouvé des spots rouges dans les chromatogrammes des vins I, II et III :

- au nord-est de la proline (Rf 0,78-0,26) composé inconnu ;
- au niveau du spot de l'histidine-arginine (Rf 0,73-0,11) la surface est de 1/6, ce spot serait celui de l'histidine ;
- une tache prolongée située entre les marqueurs alanine, la tyrosine et la baïkiaine. Ce spot pourrait être dû à un peptide.

Le vin Gévér donne, outre les mêmes spots, une tache entre la lysine et l'arginine (Rf 0,39-0,08) au lieu de la tache au-dessus de l'arginine-histidine. Elle pourrait être due à l'histidine qui aurait mal émigré.

c) Pour déterminer l'arginine, nous avons utilisé les réactifs spécifiques de SAKAGUSHI et ACHER (α -naphthol-hypochlorite-urée, BLOCK R., 1958).

Nous avons trouvé des taches dans tous les échantillons à la place de l'arginine-histidine trouvées par la ninhydrine. Dans le spot des vins I, II et III, il y a une différence d'environ 1/6 entre les surfaces des taches trouvées à l'aide du réactif d'ACHER et celle donnée par la ninhydrine ; cette différence correspondrait à l'histidine.

Pour vérifier la position de certains acides aminés, nous avons superposé les acides aminés recherchés dans l'échantillon du vin avec des acides aminés standards.

Nous avons repéré :

- l'ornithine Rf 0,23-0,10 ;
- la méthionine Rf 0,75-0,49 (même Rf que la valine) ;
- la méthionine sulfone Rf 0,68-0,23 ;
- la méthionine-sulfoxyde Rf 0,75-0,19 ;
- la glucosamine Rf 0,20-0,16. Nous ne l'avons pas trouvée dans nos échantillons, mais nous avons noté la présence d'un sucre aminé inconnu (Rf 0,42-0,64).

2° Hydrolyse du résidu de l'extrait alcoolique

Outre la détermination de l'N total, nous avons déterminé sur le résidu des vins I, II et III, les acides aminés après hydrolyse. L'hydrolyse a été effectuée à l'aide de 300 ml d'HCl 6 N à 120° (bain d'huile) pendant 36 heures.

L'HCl a été évaporé sous vide à une température de 40°C jusqu'à siccité. Nous avons repris le résidu par l'eau et recommencé l'opération cinq fois.

L'hydrolysate a été repris par 400 ml d'eau à pH 2,6 puis purifié sur une colonne de résine comme pour l'analyse des acides aminés libres.

Le microdosage de l'azote alpha aminé par la méthode de CONWAY (MICHEL, 1959) a donné des résultats beaucoup plus faibles que par la méthode chromatographique, en effet, elle ne dose ni la proline, ni le tryptophane, ni l'acide aspartique, ni le groupement guanidyl, assez abondant dans les vins. Cette méthode ne peut être conseillée pour l'analyse des acides aminés libres du vin. Les quantités suivantes des acides aminés ont été trouvées par cette méthode :

Moût	82 mg/l de NH ₂		
Vin I.....	230	—	—
Vin II	167	—	—
Vin III	170	—	—

3° Composés nucléiques

A l'aide de l'acide trichloracétique à 10 p. 100 nous avons extrait les bases (puriques et pyrimidiques), les nucléosides et les nucléotides libres, le culot contient les protéines et les composés nucléiques polymérisés (ADN et ARN).

Comme le culot était peu abondant nous ne l'avons pas hydrolysé pour déterminer l'ADN et l'ARN.

— Nucléotides.

Le TCA est éliminé par l'éther et le jus obtenu est passé sur une colonne de Dowex 1 sous forme HCOO— qui retient les nucléotides, l'effluent contient les nucléosides et les bases (G. DURAND *et al.*, 1965). Les nucléotides sont élués par gradient exponentiel d'acide formique *n*, acide formique 4 *n*, et de formiate d'NH₄, 1,6 N, acide formique 4 N. Les nucléotides sortent de la colonne dans l'ordre suivant :

— CMP, TMP, AMP et en même temps des composés phénoliques, GMP, IMP, UMP.

— Nucléosides.

L'effluent contenant les bases et les nucléosides est concentré, ajusté à pH 11,8 et passé sur une colonne de Dowex 1 sous forme OH⁺ qui retient seulement les nucléosides. Les nucléosides sont élués par gradient de formiate de NH₄ (0,02 M à 0,3 M) en diminuant le pH de 10,5 à 7,5. Nous avons séparé, cytidine, adénosine, uridine et guanosine.

— Bases.

Les bases de l'effluent sont séparées sur une colonne d'amberlite IR 120 sous forme H^+ en les éluant à l'aide d'un gradient d'acide chlorhydrique 1,5 N-6 N. Nous avons ainsi identifié la guanine et l'adénine.

Par cette méthode nous avons eu des difficultés :

1° Pour identifier les différents composés nucléiques parce qu'ils sont souillés d'impuretés (composés phénoliques), aussi les spectres sont-ils modifiés.

Pour diminuer l'importance des interférants nous avons effectué les spectres près du maximum d'absorption de chaque composé.

2° Pour déterminer quantitativement chaque composé nucléique, nous avons fait quelques corrections relatives à l'absorption des composés interférants à 310 m μ .

Les bases puriques sont relativement assez bien séparées. Pour améliorer la technique de séparation et éliminer les composés interférants (phénoliques, etc.) nous avons modifié la méthode :

a) le TCA est éliminé par l'acétate d'éthyle au lieu de l'éther pour entraîner en même temps certains composés phénoliques ;

b) nous avons passé séparément une fraction des extraits sur deux colonnes de Dowex 1 : une sous forme $HCOO^-$ pour séparer les nucléotides et l'autre sous forme OH^- pour séparer les nucléosides. L'effluent de la colonne nucléotides qui contient les nucléosides et les bases a été passé sur une colonne de résine cationique Amberlite IR 120 sous forme H^+ pour séparer les bases. La séparation des dérivés nucléiques était améliorée et nous avons trouvé quelques composés supplémentaires, mais les composés interférants (phénoliques) n'étaient pas éliminés. Les bases sont mieux séparées. L'hydrolyse préalable de tous les composés nucléiques ou bases serait sans doute une bonne méthode pour étudier les composés nucléiques des vins.

TABLEAU I

Répartition des composés azotés dans les différents échantillons étudiés

	En mg/l						
	1 N total	2 N total de l'extrait alcoolique	3 N ammo- niacal	4 N α -aminé	1 — 2 N protéique	2 — (3 + 4) N composés inconnus	N α -aminé de l'N total
Moût	274,0	176,75	37,9	101,1	97,25	37,7	36,9
Moût fermenté	78,4	37,0	0,0	8,5	41,4	28,5	10,8
Vin « Gévéor »	197,0	155,3	5,8	72,0	41,7	77,5	36,55
Vin I	781,0	655,6	41,25	340,45	125,4	273,9*	43,6
Vin II	619,0	359,25	12,1	305,15	59,75	242,0	49,3
Vin III	596,0	480,1	18,5	289,55	115,9	172,0	48,6
Hydrolysats du résidu de vin I	non analysé			31,1			
Hydrolysats du résidu de vin II	non analysé			26,05			
Résidu de l'extrait alcoolique de vin III	49,5			non analysé			

* Remarque : sur ces composés inconnus on a identifié 23,3 mg de composés nucléiques.

RÉSULTATS

Tous les résultats sont les moyennes d'au moins trois analyses indépendantes (cf. tabl.). Les quantités de chaque acide aminé sont exprimées en mg/l, en p. 100 de la somme des acides aminés totaux et en N mg/l.

TABLEAU 2

Évolution des acides aminés du moût au cours de la fermentation

	Acides aminés			
	mg/l			% de diminution
	moût	moût fermenté	différence	
*Sérine	24,3	0,75	23,55	96,9
Acide aspartique	31,1	0,5	30,6	98,3
Acide glutamique	46,8	2,75	44,0	94,1
Acide cystéique, cystine, cystéine	1,4	—	1,4	100,1
*Glycine	2,1	1,4	0,7	34,0
Lysine	1,4	1,15	0,2	15,9
Thréonine	28,5	1,3	27,2	95,4
Alanine	30,8	2,9	27,9	90,6
Glutamine	44,3	1,8	42,5	95,9
Acide γ -amino-butérique	24,6	traces	24,6	—
Valine	11,55	—	11,55	100,9
Leucine, isoleucine, phénylalanine	28,8	0,4	28,4	98,6
Proline	57,7	27,4	30,4	52,5
Histidine-arginine	185,7	9,4	176,2	94,7
Acide hydroxypipécolique	4,9	1,8	3,1	63,3
Méthionine sulfoxyde + sulfone	4,15	0,75	3,4	81,9
Tyrosine	3,3	—	3,3	100,9
Baïkiaine	2,05	1,35	0,7	34,1
Ornithine	—	0,2	—	—
Non identifiés	6,5	0,3	6,2	95,3
Sommes	539,97	54,2	485,9	89,98

La qualité de la séparation des acides aminés à l'aide de la chromatographie bidimensionnelle permet de les classer en groupes :

a) *Les acides aminés très bien séparés :*

— L'acide aspartique, l'acide glutamique, l'acide γ -aminobutyrique, la valine, la proline, la tyrosine, la thréonine, l'ornithine, la baïkiaine, l'hydroxypipécolique.

b) *Les acides aminés en faible quantité :*

— La cystine-cystéine, la méthionine sulfoxyde, la lysine, l'asparagine, la glutamine.

c) *Les acides aminés mal séparés :*

— La sérine, la glycine.

d) *Les acides aminés non séparés :*

— L'histidine, l'arginine, la phénylalanine, la leucine, l'isoleucine.

Nous avons identifié vingt et un acides aminés libres grâce à des témoins, et deux par leur Rf : la baïkiane (Rf 0,87-0,43) et le sucre aminé (Rf 0,42-0,64) (STEWART, 1962).

TABLEAU 3

Composition en acides aminés libres du vin « Gévêor »

	Acides aminés	
	mg/l	%
Acide aspartique	16,0	3,3
Acide glutamique.....	27,0	5,5
Acide cystéique, cystine, cystéine.	2,3	0,5
Sérine	10,8	2,2
Glycine	8,8	1,8
Asparagine.....	2,1	0,4
Lysine	18,1	3,7
Thréonine	11,1	2,3
Alanine.....	32,3	6,6
Glutamine	1,4	0,3
Acide γ -amino-butérique	10,4	2,1
Valine	9,0	1,85
Leucine, isoleucine, phénylalanine.	24,9	5,1
Proline	227,1	46,6
Histidine-arginine.....	64,15	13,2
Hydroxypipécolique.....	1,4	0,3
Méthionine-sulfoxyde	8,3	1,7
Tyrosine	6,6	1,4
Baïkiane	1,0	0,2
Sucre aminé	0,5	0,1
Inconnus	3,95	0,8
Sommes	487,2	99,95

Nous avons, en outre, trouvé quelques spots en faible quantité (composés inconnus). Les acides aminés libres totaux sont obtenus par la somme des acides aminés individuels déterminés par chromatographie.

Moût (cf. tabl. 2)

Celui-ci est particulièrement riche en acides aminés basiques : histidine-arginine (34,4 p. 100), puis en proline (10,6 p. 100), en glutamine (8,2 p. 100), en acide glutamique (8,65 p. 100), puis en acide aspartique (5,8 p. 100), en alanine (5,7 p. 100) et en thréonine (5,3 p. 100). Pendant la fermentation, 90 p. 100 des acides aminés libres sont consommés mais les proportions sont très différentes suivant l'acide aminé considéré. Sont faiblement diminués ; la lysine (15,9 p. 100), la glycine

(34,0 p. 100), la baïkiane (34 p. 100) et la proline (52,5 p. 100). La proportion des divers acides aminés est changée par l'action de la fermentation : la proline correspond à 50 p. 100, l'histidine et l'arginine à 17,4 p. 100 puis l'alanine à 5,4 p. 100 et l'acide

TABLEAU 4

Évolution des acides aminés libres du vin Sauvignon au cours des traitements

	Acides aminés (mg/l)			% de diminution		
	Vin I	Vin II	Vin III	Vin I	Vin II	Vin III
Acide aspartique ...	59,7	46,6	40,8	100	78,1	68,3
Acide glutamique ..	95,15	84,9	68,8	100	89,2	72,3
Sérine	51,6	41,1	31,4	100	79,7	60,9
Glycine	19,1	14,2	13,25	100	74,3	69,4
Asparagine	21,7	14,6	16,2	100	67,3	74,7
Lysine	24,8	7,2	4,2	100	29,0	16,9
Thréonine	46,9	42,6	36,6	100	90,8	78,0
Alanine	162,1	152,7	141,1	100	94,2	87,0
Acide γ -amin-butyr- rique	68,4	59,8	57,7	100	87,4	84,4
Valine	25,3	26,2	24,2	100	103,6	95,7
Leucine	37,2	17,0	12,3	100	45,75	33,6
Isoleucine	12,4	11,8	9,4	100	95,2	75,9
Phénylalanine	29,2	27,6	22,7	100	94,5	77,7
Proline	500,8	499,4	480,4	100	99,7	95,9
Histidine	40,3	27,7	20,05	100	68,7	49,75
Arginine	560,9	510	500,0	100	90,9	98,1
Hydroxypipécolique	16,9	30,0	37,4	100	177,5	221,3
Méthionine sulfoxide	24,3	7,3	9,8	100	30,0	40,3
Tyrosine	23,1	20,35	16,75	100	88,1	72,5
Baïkiane	1,1	0,8	3,3	100	72,7	300,0
Ornithine	5,05	3,3	2,4	100	65,3	47,5
Sucre aminé	1,8	0,9		100	50,0	—
Nord-est : ac. aspar- tique (Rf 0,30-0,33)	—	1,0	—	—	—	—
Est d'ac. glutamique (Rf. 0,35-0,39)....	2,5	3,8	—	—	152,0	—
Est de thréonine (Rf. 0,50-0,31)....	1,4	1,0	—	100	71,4	—
Sommes	1 831,7	1 651,85	1 548,95	100	90,2	84,6

glutamique à 5,0 p. 100. Au cours de la fermentation la glutamine a presque complètement disparu, mais des sucres aminés apparaissent. Au cours de l'autolyse des levures, le vin s'enrichit en la plupart des acides aminés.

Vin « Gévéor » (cf. tabl. 3)

Des quantités semblables des différents acides aminés libres ont été trouvées dans le vin doux « Gévéor ». On ne connaît malheureusement pas les traitements effectués sur le vin « Gévéor » (acheté dans le commerce).

Sauvignon (cf. tabl. 5)

Les échantillons de *Sauvignon* sont riches en acides aminés ; nous avons trouvé des quantités équivalentes et importantes de proline et d'arginine (500 mg/l) puis de l'alanine (150 mg/l) et de l'acide glutamique (90 mg/l). Les autres acides aminés sont en plus faibles quantités.

TABLEAU 5
Composition en acides aminés libres du vin Sauvignon

	N	Acides aminés (mg/l)	
Acide aspartique	6,3	4,9	4,3
Acide glutamique	9,1	8,1	6,55
Sérine	6,9	5,5	4,2
Glycine	3,6	2,65	2,5
Asparagine	4,6	3,1	3,4
Lysine	4,75	1,4	0,8
Tréonine	4,5	5,0	4,3
Alanine	25,5	24,0	22,2
Acide γ -amino-butyrique.....	9,3	8,1	7,8
Valine	3,0	3,1	2,9
Leucine	4,0	1,8	1,3
Isoleucine	1,3	1,3	1,0
Phénylalanine	2,5	2,3	1,9
Proline	60,95	60,8	58,5
Histidine	10,9	7,5	5,4
Arginine	174,8	158,9	155,8
Hydroxypipécolique	1,6	2,9	3,6
Méthionine sulfoxide	2,3	0,7	0,9
Tyrosine	1,8	1,6	1,3
Baïkaiaine	0,1	0,1	0,4
Ornithine	1,1	0,7	0,5
Sucre aminé	0,2	0,1	—
Nord-est d'acide aspartique (Rf. 0,3-0,33).....	—	0,1	—
Est d'acide glutamique (Rf 0,35-0,39).....	0,25	0,4	—
Est de thréonine (Rf. 0,50-0,31).	0,1	0,1	—
Sommes	340,45	305,15	289,55

A l'opposé de la plupart des auteurs, nous avons trouvé dans les vins *Sauvignon* une grande quantité d'arginine (30 p. 100) et très peu d'histidine (2 p. 100). Les acides aminés soufrés n'étaient présents qu'à l'état de traces.

Influence de la filtration (cf. tabl. 4)

La filtration du moût pendant la fermentation appauvrit faiblement le vin en acides aminés si on laisse le vin en présence des lies. La diminution des divers acides aminés dans le vin par la filtration des moûts est variable. La valine et la proline ne changent pas, mais la leucine et la lysine diminuent de 2/3. La première filtration

a diminué les acides aminés libres de 10 p. 100, la seconde encore de 5,5 p. 100. Il est très important quand on fait la filtration de bien séparer les levures du moût fermenté tout de suite après la fermentation, pour qu'il ne se produise pas d'autolyse des levures qui enrichit de nouveau le vin en divers acides aminés si on veut diminuer la quantité d'acides aminés libres.

TABLEAU 6

Composition en acides aminés des résidus d'extrait alcoolique de vins Sauvignon.

	Acides aminés (mg/l)		Acides aminés (% du total)	
	Vin I	Vin III	Vin I	Vin III
Acide aspartique	21,2	16,9	12,4	12,2
Acide glutamique	12,45	10,7	7,3	7,7
Sérine	15,9	12,1	9,3	8,7
Glycine	9,9	9,3	5,8	6,7
Lysine	4,8	4,5	2,8	3,3
Thréonine	15,6	12,75	9,1	9,2
Alanine	9,4	7,85	5,5	5,7
Valine	3,7	3,2	2,2	2,3
Leucine	10,2	3,7	6,0	2,7
Isoleucine	7,15	2,6	4,2	1,9
Phénylalanine	—	1,5	—	1,1
Proline	—	2,4	—	1,7
Histidine	5,6	4,2	3,3	3,0
Arginine	47,95	41,8	28,05	30,2
Hydroxypipécolique	1,1	0,7	0,6	0,5
Méthionine sulfoxide	1,3	—	0,8	—
Tyrosine	1,5	0,8	0,9	0,6
Sucre aminé	0,6	0,5	0,35	0,4
Ornithine	1,4	1,9	0,8	1,4
Nord-est de valine (Rf. 0,56-0,51).....	0,7	0,4	0,4	0,3
Est d'acide glutamique (Rf. 0,35-0,39).....	0,5	0,6	0,3	0,4
Sommes	170,95	138,40	100,10	100,00

On peut supposer la présence de petits peptides :

— la révélation à la ninhydrine des chromatogrammes fait apparaître des traînées diffuses et non identifiées ;

— les réactions spécifiques étaient positives pour des composés non révélables par la ninhydrine.

En faisant le bilan azoté des différents composés analysés, nous voyons qu'une certaine quantité de l'N de l'extrait alcoolique n'a pas été identifiée (cf. tabl. I). Cette fraction peut correspondre à de petits peptides et aussi à des composés nucléiques que nous avons cherché à analyser.

L'analyse de l'hydrolysate du résidu de l'extrait alcoolique nous a permis de trouver les mêmes acides aminés mais en proportions très différentes : arginine (28 p. 100), acide aspartique (14,4 p. 100), thréonine (9,3 p. 100), acide glutamique

(7,3 p. 100), glycine (6 p. 100) et alanine (5,5 p. 100). La proline est à l'état de traces.

En appliquant la méthode indiquée plus haut, nous avons trouvé dans le vin *Sauvignon* les divers composés nucléiques indiqué dans le tableau 7.

Les résultats sont approximatifs mais indiquent que les composés existent en quantités appréciables dans les vins.

TABLEAU 7
Composés nucléiques du vin Sauvignon
(en N mg/l)

	N mg/l
Guanine	0,9
Adénine	0,7
Cytosine	1,8
Hypoxanthine	0,6
Xanthine	2,6
Thymine	traces
Uracile	»
Bases	6,0
Cytidine	5,0
Thymidine	0,5
Adénosine	0,3
Uridine	1,3
Guanosine	2,0
Nucléosides	9,1
GMP	4,0
CMP	2,0
AMP	0,1
TMP	0,5
IMP	1,0
Nucléotides	7,6
Composés nucléiques totaux	22,7

En conclusion, par la méthode décrite de chromatographie sur papier bidimensionnelle on sépare bien la plupart des acides aminés libres du vin. En connaissant chaque acide aminé on peut obtenir avec précision la somme des acides aminés libres.

Par la méthode chromatographique sur colonne on sépare bien les bases puriques et pyrimidiques. Le dosage précis des nucléotides et nucléosides exigerait l'élimination des composés interférents.

Les bilans azotés montrent qu'une partie des composés azotés est indéterminée ; ce seraient peut-être de petits peptides.

Pendant la fermentation, les acides aminés diminuent considérablement, mais le vin s'enrichit au cours de l'autolyse des levures. Par conséquent, la filtration du moût pendant la fermentation appauvrit faiblement le vin en acides aminés. Si on veut diminuer le N du vin, il est très important de bien séparer les levures du moût fermenté tout de suite après la fermentation.

Reçu pour publication en septembre 1965.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes vifs remerciements à M. FAUCONNEAU, directeur du Laboratoire des Métabolismes au Centre national de Recherches zootechniques à Jouy-en-Josas, pour toute l'aide reçue pendant mon travail. Toutes les analyses des acides aminés libres et composés nucléiques furent accomplies dans son laboratoire et sous sa conduite bienveillante. Mes remerciements vont aussi au personnel du C. N. R. Z. pour leur aide et leur sympathie.

SUMMARY

THE STUDY OF NITROGENOUS COMPOUNDS IN WINE

We have studied certain nitrogenous compounds, in particular the free amino acids in fermented must and wine, in order to determine the relative proportions of these compounds. We have also investigated the influence of filtration of the must on the content of these nitrogenous compounds in the wine.

In order to obtain biological stabilization of sweet and semi-sweet Slovenian wine, we have studied the influence of nitrogenous compounds on the development of wine yeasts. The stabilization of wines by biological reduction of the content of nitrogenous compounds in wine has been used for a long time in the production of *Asti Spumante*.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BIDAN P., ANDRÉ L., 1958. Sur la composition en acides aminés de quelques vins. *Ann. Technol. agric.*, **4**, 403-432.
- BLOCK R. J., 1958. *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis*. New York.
- BOURDET A., HÉRARD J., 1958. Influence de l'autolyse des levures sur la composition phosphorée et azotée des vins. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 177-202.
- CARLES J., LAMAZOU-BETBEDER M., PECH R., 1958. Les acides aminés libres du vin. *C. R. Acad. Sci.*, **246**, 1254-1257.
- CASTOR J., 1953. The free amino acids of musts and wines. *Food Res.*, **18**, 139-146.
- CASTOR J., ARCHER T., 1956. Amino acids in must and wines. Proline, serine and threonine. *Amer. J. Oenol.*, **7**, 19-25.
- CONWAY E., 1957. *Microdiffusion analysis and volumetric error*. London.
- CHARGAFF E., DAVIDSON J. N., 1955. The nucleic acids. *Chemistry and Biology*, **1**, **2**, **3**. New York.
- DIMOTAKIS K., 1955. *Les acides aminés dans les vins grecs*. Chimica Chronica, Athènes 20. A. 10.
- DRAWERT F., 1963. Biochemische-Physiologische Untersuchungen an Traubenbeeren. *Vitis*, **4**, 49-56.
- DUPONT G., 1953. Identification des acides aminés de moûts de raisin par chromatographie sur papier. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 95-98.
- DURAND G., FAUCONNEAU G., PENOT E., 1965. Étude biochimique de la croissance de l'intestin grêle, du foie et de la carcasse du rat ; rôles respectifs de la multiplication et du grandissement cellulaires, *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, **5**, 163-187.
- FAUCONNEAU G., PION R., 1959. L'utilisation de diverses méthodes de dosage des acides aminés dans les études nutritionnelles. Intérêt et limites de la chromatographie quantitative sur papier A. E. C. 112-119. Cahier n° 4.
- HENNIG K., 1943. Bilans de l'azote dans les moûts et les vins nouveaux en fermentation. *Bull. O. I. V.*, **159**, 82-86.
- KISKOVSKII Z. N., 1963. Aminokislottinii sostav nekotarih vin. *Vinodelie i vinogradarstvo S. S. S. R.*, **1**, 13-15.
- LAFON-LAFOURCADE S., GUIMBERTEAU G., 1962. Évolution des amino-acides au cours de la maturation des raisins. *Vitis*, **3**, 130-135.

- LAFON-LAFOURCADE S., PEYNAUD E., 1961. Composition azotée des vins en fonction des conditions de vinification. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 143-160.
- LÜTHI Hs. VETSCH U., 1952. Papierchromatographische Bestimmung von Aminosäuren in Weinen. *Schweiz. Z. Obst Weinbau*, **19**, 390-394, **20**, 405-408.
- MICHEL M. C., 1959. Techniques de microdosage de l'azote alpha aminé A. E. C. 63-71. Cahier n° 4.
- MUTH F., MALSCH L., 1934. Versuche zur Aufstellung einer Stickstoffbilanz in Traubemosten und Weinen. *Z. Unters. Lebensm.*, **68**, 487.
- PEYNAUD E., 1936. L'azote aminé et l'azote amidé dans les vins de Bordeaux. *Ann. Fals. Fraudes*, **32**, 228-243.
- PEYNAUD E., LAFON-LAFOURCADE, 1962. Sur la nutrition azotée des levures de vin. *Rev. Ferm. Ind. Alim.*, Bruxelles, **17**, 1, 11-21.
- PEYNAUD E., MAURIE A., 1953. Sur l'évolution de l'azote dans les différentes parties du raisin au cours de la maturation. *Ann. Technol. agric.*, **1**, 15-25.
- POUX C., FLANZY C., FLANZY M., 1964. Les levures alcooliques dans les vins : Protéolyse et protéogénèse. *Ann. Technol. agric.*, **13** (1), 5-18.
- PROCOPIO M., CALE M. T., 1955. Les amino-acides libres dans les vins. *Bull. O. I. V.*, 295, 208 et 296, 209-212.
- RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1939. L'azote aminé et l'azote amidé dans les vins de Bordeaux. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, **6**, 784-785.
- SISAKIAN N. M., BEZINGER E. N., 1953. Izmenie aminokislotojnogo sostava vina pri ego pervienoj technologii. *Biochimija*, **18**, 41, 412-422.
- STEWART, POLLARD, 1963. *The soluble, nitrogenous constituents of plants. Amino acid pools distribution, formation and function of freeamino-acids.* Edited by Holden, J. New York.
- TARANTOLA C., 1954. Separazione e identificazione cromatografica degli aminoacidi nei vini. *Atti Acad. Ital. delle Vite e del vino Siena*, **6**, 146-163.
- TARANTOLA C., 1955. La détermination de l'azote assimilable par les levures dans les moûts et dans les vins. *Bull. O. I. V.*, **295**, 201-208.
- VALAIZE N., DUPONT G., 1951. Les acides aminés et le bouquet des vins. *Ind. Agric. Alim.*, 245-250.
- WEISS H., ROUSSET A., BONNET R., 1959. L'évolution des différentes formes d'azote au cours de la fermentation des moûts de raisins provenant de cépages d'Alsace. *C. R. Acad. Sci.*, **249**, 1796-1798.
- WEISS H., ROUSSET A., MAILLARD M. Th., BONNET R., 1960. L'évolution qualitative et semi-quantitative des acides aminés au cours de la fermentation des moûts de raisin provenant de cépages d'Alsace. *C. R. Acad. Sci.*, **250**, 1322-1324.
- WOLFE M., 1957. The quantitative determination of amino-acids by paper chromatography. A solvent to replace phenol. *Biochim. Biophys. Acta*, **23**, 186-191.

DISCUSSION ET APPLICATION DES MÉTHODES MODERNES DE DOSAGE DES ANTHOCYANES ET DES TANINS DANS LES VINS

P. RIBÉREAU-GAYON et N. NEDELTCHEV ⁽¹⁾

Institut d'Œnologie de l'Université de Bordeaux ⁽²⁾

SOMMAIRE

Les anthocyanes et les tanins sont des constituants importants des vins ; ils donnent aux vins rouges leurs caractères organoleptiques particuliers qui les différencient des vins blancs.

L'étude de ces constituants, au moins aussi importante que celle des sucres, des alcools ou des acides, n'a pu être absorbée efficacement que récemment, à la suite des progrès qui ont été réalisés pendant ces dernières années sur la connaissance théorique des composés phénoliques.

Nous discutons dans cet article les méthodes récentes de dosage des anthocyanes et des tanins ; nous envisageons également quelques applications de ces méthodes.

LE DOSAGE DES ANTHOCYANES

Le problème du dosage des pigments rouges, ou anthocyanes, du raisin et du vin, a été étudié en U. R. S. S. par plusieurs auteurs il y a une quinzaine d'années, en particulier par DOORMICHIDZÉ (1948), par WILLIAMS et TARANOVA (1950 et 1951), et par DOORMICHIDZÉ et KHATCHIDZÉ (1952). Ces travaux ont été repris par DOORMICHIDZÉ en 1955 dans un ouvrage important. L'ensemble des résultats des auteurs soviétiques a été résumé en français par DEIBNER (1952) et en anglais par ESAU (1959).

⁽¹⁾ Chercheur scientifique à l'Institut d'Œnologie de Sofia (Bulgarie), en stage à l'Institut d'Œnologie de Bordeaux (mars à juillet 1965).

⁽²⁾ Travail effectué en collaboration avec l'Institut national de la Recherche agronomique.

Ces travaux, tout à fait originaux, présentaient, au moment de leur publication, un intérêt indéniable ; cependant ils ont été effectués à une époque où l'on n'avait pas une connaissance suffisante de la nature des pigments anthocyaniques du raisin ; cette connaissance est maintenant acquise à la suite, pour une part, des travaux de l'un d'entre nous (P. RIBÉREAU-GAYON, 1959). Il apparaît aujourd'hui, que certaines hypothèses sur lesquelles étaient basées les méthodes soviétiques n'ont pas été entièrement confirmées par les recherches récentes et c'est certainement la raison pour laquelle l'utilisation de ces méthodes ne s'est pas développée.

Ceci est particulièrement vrai pour les différentes méthodes préconisées (WILLIAMS et TARANOVA, 1951) pour la séparation des aglycones (œnidine, ancienne dénomination du malvidol) et des glucosides (œnine qui est le monoglucoside du malvidol) ; il semble en effet bien acquis aujourd'hui que, aussi bien les pellicules de raisin que le vin, ne contiennent pas d'aglycones anthocyaniques à l'état libre. L'alcool amylique extrait non seulement les aglycones, mais aussi, bien que plus difficilement, les monoglucosides. La coloration extraite du vin par ce solvant n'est pas due à des aglycones anthocyaniques mais à des hétérosides ; nous l'avons démontré par chromatographie sur papier (fig 1).

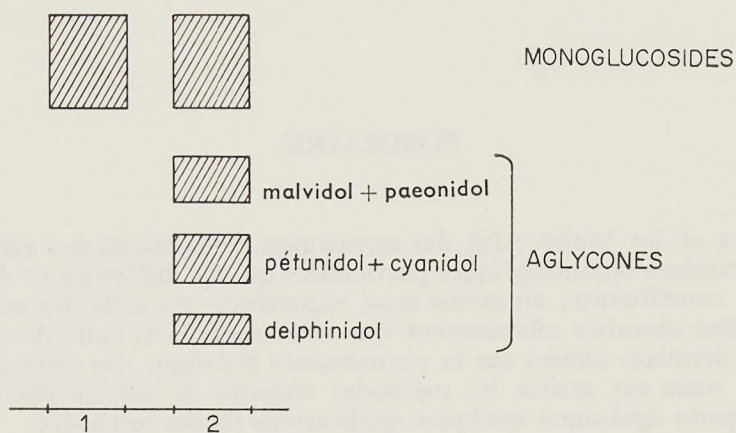


FIG. 1. — Chromatographie (solvant Forestal) des pigments extraits par l'alcool amylique, dans le vin rouge non hydrolysé (1) et dans le vin rouge partiellement hydrolysé (2)

On peut faire une remarque analogue à propos de la première méthode de DOURMICHIDZÉ (1948) qui envisage le dosage des anthocyanes par la détermination des groupements méthoxyles (OCH_3) de la molécule du malvidol que cet auteur supposait, à cette époque, être l'unique pigment anthocyanique du raisin. On sait aujourd'hui (P. RIBÉREAU-GAYON, 1953 ; DOURMICHIDZÉ, 1955) que le raisin contient, à côté du malvidol (diméthoxylé), du pétunidol et du paeonidol (monométhoxylé), également du delphinidol (non méthoxylé). D'autre part le raisin contient aussi des acides-phénols méthoxylés (acides férulique, syringique, et vanillique) en quantité appréciable (50 mg/l) (P. RIBÉREAU-GAYON, 1964).

Pour toutes ces raisons, il apparaît clairement aujourd'hui, mais ce n'était pas évident en 1950, qu'il n'est pas possible de baser une méthode de dosage des anthocyanes du vin sur la détermination des groupements méthoxyles. On peut, comme l'a fait J. RIBÉREAU-GAYON (1933), doser les groupements méthoxyles dans un produit isolé du vin dans des conditions bien définies, mais il n'est pas possible de

rapporter le chiffre obtenu au poids d'anthocyanes que contient ce vin. D'ailleurs les chiffres de DOURMICHIDZÉ et KHATCHIDZÉ (1952), qui ont comparé la méthode précédente et une méthode colorimétrique sur une série d'échantillons de vin, font apparaître entre ces deux méthodes des différences importantes (75 mg/l avec une méthode et 545 mg/l avec l'autre méthode par exemple). D'après les auteurs ceci serait dû au fait que les anthocyanes sont partiellement sous forme de leucodérivés incolores, non dosés par la méthode colorimétrique ; cette explication ne nous paraît pas suffisante puisque la courbe de référence et les dosages proprement dits sont effectués dans les mêmes conditions de pH, qui est le facteur essentiel de la transformation des anthocyanes en dérivés incolores.

Il nous semble beaucoup plus vraisemblable que les principes des méthodes sont responsables des différences observées.

La méthode colorimétrique de DOURMICHIDZÉ et KHATCHIDZÉ (1952) est la plus intéressante ; elle est aussi la plus simple. Elle consiste à mesurer la coloration du vin à 530 m μ dans des conditions bien définies et à comparer le chiffre obtenu avec les résultats donnés par un produit de référence à différentes concentrations, résultats que l'on trouvera dans l'ouvrage de DOURMICHIDZÉ (1955) à la page 109. Le produit de référence utilisé par les auteurs russes est un aglycone (œnidine, ancienne dénomination du malvidol) ; par conséquent pour exprimer le résultat sous forme d'hétéroside, il faut multiplier le chiffre obtenu par 1,44 qui est le rapport des poids moléculaires du chlorure du monoglucoside du malvidol (C₂₃H₂₅O₁₂Cl) et du chlorure du malvidol proprement dit (C₁₇H₁₅O₇Cl) ; c'est ainsi que nous exprimerons les résultats que nous avons obtenus avec cette méthode.

La principale objection que l'on puisse faire à cette méthode est de ne pas tenir compte de l'influence éventuelle de corps colorés autres que les anthocyanes et participant à la coloration, en particulier les tanins.

Les méthodes qui ont été développées récemment à Bordeaux (P. RIBÉREAU-GAYON et E. STONESTREET, 1965 *a*), en s'inspirant des travaux de SWAIN et HILLIS (1959), cherchent justement à éliminer l'interférence des tanins et des autres corps colorés. Le principe de la première méthode repose sur la variation de la coloration des anthocyanes en fonction du pH ; la deuxième méthode utilise la décoloration des anthocyanes par le bisulfite de sodium ; ces méthodes supposent que les substances susceptibles d'interférer, d'une part ne subissent pas de variation de leur coloration en fonction du pH et, d'autre part, ne sont pas modifiées par le bisulfite de sodium. Dans les deux cas on compare le résultat obtenu à une courbe étalon obtenue à partir d'un échantillon d'anthocyanes cristallisées, préparé à partir des pellicules de raisins du même cépage et contenant tous les pigments de ce cépage.

Nous avons rassemblé sur le tableau 1 les résultats que nous avons obtenus sur une série de vins, avec les deux méthodes de RIBÉREAU-GAYON et STONESTREET et avec celle de DOURMICHIDZÉ et KHATCHIDZÉ.

On notera sur ce tableau que les trois méthodes donnent des résultats relativement comparables pour les vins jeunes ; par contre, les différences sont appréciables pour les vins plus vieux. Dans certains cas la méthode de DOURMICHIDZÉ et KHATCHIDZÉ donne des résultats plus de deux fois supérieurs à ceux donnés par les autres méthodes.

Cette observation peut s'expliquer à l'aide de l'interprétation que l'un de nous

a donné récemment (P. RIBÉREAU-GAYON et E. STONESTREET 1965 a, 1965 c) de la coloration des vins rouges.

Dans les vins jeunes la coloration est due essentiellement aux anthocyanes des raisins, par conséquent une mesure colorimétrique directe, au maximum d'absorption des anthocyanes, est valable pour le dosage de ces pigments (méthode DOURMICHIDZÉ et KHATCHIDZÉ).

Lorsque le vin vieillit, les anthocyanes disparaissent progressivement par un mécanisme inconnu ; dans le même temps les tanins subissent une condensation progressive, peut-être accompagnée d'une oxydation, qui intensifie leur coloration propre ; finalement ce sont les tanins qui sont responsables de la coloration rouge-orangé tuilée caractéristique des vins vieux. Par conséquent il n'est plus possible dans ce cas d'effectuer une mesure colorimétrique directe à 520 ou 530m μ pour doser les anthocyanes ; il est indispensable d'utiliser une méthode qui tienne compte de l'interférence éventuelle des tanins.

TABLEAU I

Comparaison des différentes méthodes de dosage des anthocyanes dans le vin rouge

Numéros des échantillons	Millésimes	Méthodes R.-G. et S.		Méthode D. et K. (mg/l)
		Différence de pH (mg/l)	Décoloration par SO ₂ (mg/l)	
1	1964	262	257	287
2	1964	320	317	315
3	1963	77	79	92
4	1961	102	102	120
5	1960	42	45	91
6	1955	27	32	69
7	1954	17	22	49
8	1938	17	20	53
9	1929	32	32	77

D'ailleurs il n'est pas impossible que les méthodes proposées ne résolvent que partiellement ce problème. En particulier on peut supposer que la teneur en anthocyanes tombe en réalité à 0 au cours du vieillissement et que les chiffres limites obtenus (20 à 30 mg/l), qui restent constants après une dizaine d'années de conservation, sont dus en réalité à un artefact provenant du principe des méthodes de dosage.

LE DOSAGE DES TANINS

Dans ce domaine également l'analyse des vins n'a pas fait de progrès pendant longtemps et les ouvrages classiques (P. JAULMES, 1952 ; J. RIBÉREAU-GAYON et E. PEYNAUD, 1958) ne signalent aucune méthode vraiment satisfaisante pour effectuer le dosage des tanins.

On utilise couramment la propriété des composés phénoliques d'être oxydés à froid par le permanganate de potassium ; mais comme les différents composés phénoliques, à concentration égale, ne réduisent pas la même quantité de permanganate, il est difficile d'exprimer le résultat en poids de substances phénoliques ; on utilise de préférence un indice conventionnel, « l'indice de permanganate », qui représente le nombre de milliéquivalents de permanganate de potassium réduit par les composés phénoliques d'un litre de vin (J. RIBÉREAU-GAYON et A. MAURIÉ, 1942). Les tanins représentant la fraction la plus importante des composés phénoliques, l'indice de permanganate est une bonne indication, facile à obtenir, du taux de tanins.

Pour effectuer un dosage des tanins plus précis, DOURMICHIDZÉ (1955) déduit de l'indice de permanganate la valeur due aux anthocyanes, calculée, à partir de la concentration en anthocyanes, par une relation établie expérimentalement (1 cm³ de KMnO₄ N/10 oxyde 6,95 mg d'œnidine (malvidol)). A partir de cette valeur corrigée de l'indice de permanganate, une autre relation expérimentale (1 cm³ de KMnO₄ N/10 oxyde 5,1 mg de tanin de raisin) donne le poids de tanins contenu dans le vin. Cette méthode suppose que les composés phénoliques du vin rouge sont constitués uniquement par des anthocyanes et par des tanins ; or, on sait aujourd'hui (P. RIBÉREAU-GAYON, 1964) que le vin contient des acides-phénols dont la concentration (100 mg/l) peut être du même ordre que celle des anthocyanes. D'autre part nous avons longuement insisté à plusieurs reprises (P. RIBÉREAU-GAYON et E. STONESTREET, 1965 *b*) sur l'influence de la structure des tanins condensés sur leurs propriétés ; certainement cette structure influe sur l'oxydation des tanins par le permanganate.

D'ailleurs BATE-SMITH (1954) a signalé que l'oxydation par le permanganate des différents composés phénoliques se faisait d'une façon très différente selon leur nature ; seuls réagissent les *ortho*- et *para*-diphénols, les monophénols et les *méta*-diphénols ne réagissent pas ; enfin certains composés non phénoliques réagissent, par exemple l'acide cinnamique par l'intermédiaire de sa double liaison.

Pour ces différentes raisons il apparaît qu'une méthode rigoureuse de dosage des tanins ne peut pas être basée sur l'oxydation de ces corps par le permanganate. Cependant ce réactif permet de déterminer un indice intéressant en œnologie pour comparer plusieurs vins, car il y a une relation directe entre sa valeur et la teneur en substances phénoliques qui est elle-même en rapport avec les caractères organoleptiques (dureté, astringence, souplesse) sans que la relation soit absolue car d'autres facteurs interviennent (acidité, acétate d'éthyle). (J. RIBÉREAU-GAYON et E. PEYNAUD, 1958).

Les connaissances modernes sur la structure des tanins condensés ont montré que ces corps sont constitués par la polymérisation de flavane-3,4-diols, ou leucoanthocyanes, qui ont la propriété de se transformer en anthocyanes colorées en rouge par chauffage en milieu acide ; c'est actuellement cette réaction qui est la plus utilisée pour le dosage des tanins condensés ; c'est celle que nous avons utilisée (P. RIBÉREAU-GAYON et E. STONESTREET, 1965 *c*).

Dans le tableau 2 nous avons comparé les résultats obtenus sur une série de vins à l'aide de la méthode précédente et de la méthode de DOURMICHIDZÉ (1955).

On constate sur les chiffres de ce tableau que les deux méthodes, qui reposent sur des principes différents, donnent des résultats du même ordre de grandeur ; la méthode de DOURMICHIDZÉ donne des chiffres qui sont toujours sensiblement plus faibles. La variation du taux de tanins, d'un échantillon à un autre, est identique avec les deux méthodes et suit bien la variation de l'indice de permanganate.

TABLEAU 2

Comparaison des différentes méthodes de dosage des tanins

Numéros des échantillons	Millésimes	Méthodes R.-G. et S. (g/l)	Méthode D. (g/l)	Indice de permanganate
1	1964	2,3	1,9	40
2	1964	2,6	1,9	41
3	1963	2,1	1,4	29
4	1960	2,1	1,4	28
5	1955	2,2	1,5	29
6	1954	2,1	1,5	30
7	1938	3,2	2,9	58

Étant donné le manque de spécificité de l'oxydation par le permanganate de potassium, il semble préférable d'utiliser la transformation des leucoanthocyanes en anthocyanes pour le dosage des tanins du vin.

APPLICATION DES MÉTHODES PRÉCÉDENTES

CONDITIONS EXPÉRIMENTALES

Les méthodes de dosage des anthocyanes et des tanins ont été appliquées à une série de vins préparés en Bulgarie à titre expérimental, en vue de suivre la dissolution des composés phénoliques au cours de la vinification.

On a utilisé une vendange du cépage bulgare *Chiroka Melnichka loza*, saine et bien mûre (taux de sucre : 225 g/l, acidité : 5 g/l exprimée en acide tartrique).

La vendange a été foulée, éraflée, sulfitée à raison de 10 g par hectolitre ; elle a ensuite été répartie de façon homogène dans des récipients de 8 litres etensemencée avec un levain en pleine activité à raison de 20 cm³ de levain pour 1 litre de vendange.

La fermentation s'est déroulée à 20°C dans des récipients qui n'étaient pas hermétiquement fermés ; le chapeau était immergé trois fois par jour dans le jus en fermentation.

Huit échantillons ont été mis en expérimentation ; l'élimination des parties solides a été faite respectivement au 2^e, 3^e, 4^e, 5^e, 7^e, 8^e, 9^e et 11^e jour après le début de l'expérience. La fermentation était achevée au 9^e jour.

Afin de se rapprocher au maximum des techniques de vinification traditionnelle en Bulgarie, on a recueilli uniquement le jus de goutte.

Parallèlement, et sur la même vendange, on a réalisé d'autres conditions expérimentales dans lesquelles, soit les raisins entiers, soit la vendange écrasée, étaient chauffés avant fermentation pour accélérer la dissolution des composés phénoliques. Dans ce cas, la fermentation a été conduite sans macération des composés phénoliques (vinification en blanc) ou avec macération de 3 jours avant le départ de la fermentation.

L'expérimentation a été conduite pendant les vendanges 1964 ; les analyses ont été faites au mois de mai 1965.

INFLUENCE DU TEMPS DE MACÉRATION
 SUR LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES

Les résultats obtenus sont rassemblés sous forme de courbes (fig. 2) ; les anthocyanes sont dosés par la méthode par différence de pH, les tanins à l'aide de la réaction des leucoanthocyanes ; enfin nous avons suivi également l'intensité colorante exprimée par la somme des densités optiques à 520 et à 420 m μ sous 1 mm d'épaisseur (SUDRAUD, 1958).

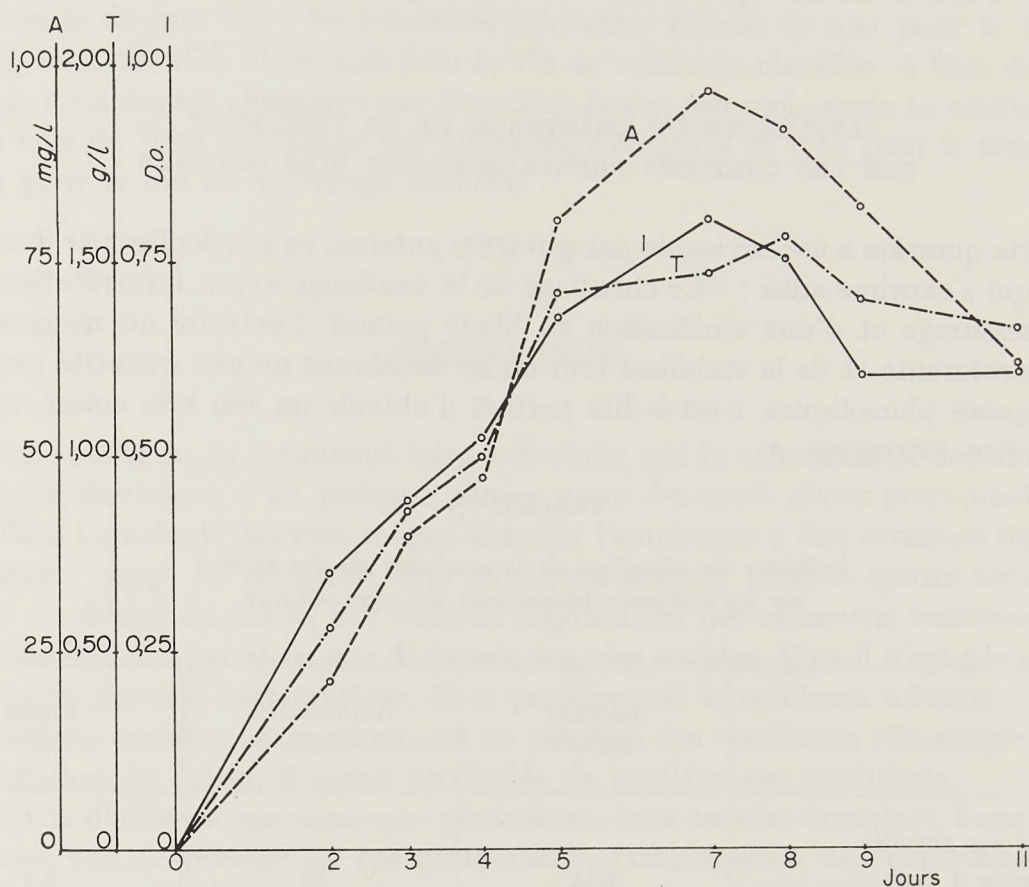


FIG. 2. — Evolution des composés phénoliques en fonction du temps de macération.

A = Anthocyanes.
 T = Tanins.
 I = Intensité colorante.

On constate que pendant les 7 premiers jours de macération ces trois valeurs augmentent régulièrement ; elles passent ensuite par un maximum puis diminuent.

Il était connu (FERRÉ, 1957 ; SUDRAUD, 1964) que, au cours de la vinification, l'intensité colorante passe par un maximum, atteint plus ou moins rapidement en fonction des conditions de la fermentation, et diminue ensuite alors que les composés phénoliques totaux (tanins) continuent à se dissoudre.

Dans l'expérience de la figure 2, on constate d'une part que la diminution de l'intensité colorante, à partir du 7^e jour de macération, est liée à une baisse des pigments anthocyaniques et d'autre part que le taux de tanins diminue également ; ce dernier point est confirmé par la variation de l'indice de permanganate tout à fait parallèle à la variation du taux de tanins.

Nous observons donc une évolution des tanins au cours de la vinification qui

ne correspond pas tout à fait avec les résultats antérieurs. Mais il faut bien préciser que dans cette expérience on a tenu compte uniquement des vins de goutte ; il est certain que, pour suivre l'extraction des composés phénoliques au cours de la vinification, il serait préférable de suivre l'ensemble, vin de goutte et vin de presse. Cependant ce mode opératoire présente un intérêt pratique évident puisqu'il correspond à la technologie classique en Bulgarie.

On remarquera par ailleurs que ces vins sont pauvres en composés phénoliques (indice de permanganate : 25 à 30, teneur en anthocyanes : 80 à 100 mg/l) ; ceci est dû, d'abord au fait qu'il s'agit de vin de goutte, également à la nature du cépage.

INFLUENCE DU CHAUFFAGE DE LA VENDANGE SUR LES COMPOSÉS PHÉNOLIQUES DES VINS OBTENUS

Cette question a été envisagée par plusieurs auteurs, en particulier par SUDRAUD (1964) qui s'exprime ainsi : « Le chauffage de la vendange avant fermentation suivi d'un pressurage et d'une vinification en blanc permet d'extraire au maximum la matière colorante et de la stabiliser tout en ne dissolvant qu'une quantité moyenne de composés phénoliques, c'est-à-dire permet d'obtenir un vin très coloré tout en restant peu astringent. »

TABLEAU 3

*Influence du chauffage de la vendange ou des raisins
sur les composés phénoliques des vins obtenus*

	Intensité colorante	Anthocyanes (mg/l)	Tanins (g/l)
Vendange non chauffée :			
macération 3 jours	0,44	40	0,9
macération 7 jours	0,81	98	1,5
Vendange écrasée chauffée :			
macération 0 jour	1,03	113	1,5
macération 3 jours	1,08	133	2,1
Raisins entiers chauffés :			
macération 0 jour	1,03	128	1,8
macération 3 jours	1,19	128	1,9

Les résultats que nous avons obtenus sont tout à fait en accord avec ceux de SUDRAUD. On notera, sur les chiffres du tableau 3, que le chauffage de la vendange suivi d'une « vinification en blanc » (macération 0 jours), permet d'obtenir des vins sensiblement plus colorés que par la technique classique (vendange non chauffée, macération 7 jours) ; ceci est dû à une augmentation du taux des anthocyanes, mais on n'observe pas une augmentation parallèle du taux de tanins.

Cependant, d'après GUÉRASSIMOV (1959), les effets du chauffage ne sont pas définitifs et disparaissent au cours du vieillissement.

Nous sommes arrivés à une conclusion identique en étudiant des vins d'un grand cru de la région bordelaise de la récolte 1956 ; cette année a été caractérisée par des conditions climatiques très défavorables et les vins obtenus avaient une coloration faible. En vue d'accroître l'intensité colorante, une tentative de chauffage de la vendange a été conduite sur une fraction de la récolte. Aussitôt après la vinification, le vin de vendange chauffée était nettement plus coloré que le témoin ; cette différence s'est estompée au cours du vieillissement et, lors d'une analyse effectuée au mois de juin 1965, les intensités colorantes étaient de 0,41 pour le vin de vendange non chauffée et de 0,48 pour le vin de vendange chauffée. A titre de comparaison, les analyses effectuées par SUDRAUD (1964), un mois après la vinification, sur des vins de 1958 ont donné des intensités colorantes de 0,52 pour le témoin et de 0,84 pour le vin de vendange chauffée.

CONCLUSIONS

Nous voudrions en terminant faire remarquer que la connaissance des composés phénoliques devraient, d'ici quelques années, avoir des applications pratiques importantes dans l'œnologie des vins rouges. En effet l'empirisme a fixé certaines règles de vinification ; ainsi, en Bordelais, aux cuvaisons longues (trois à quatre semaines), utilisées au début du siècle, ont succédé aujourd'hui des cuvaisons beaucoup plus courtes (huit à dix jours) en vue d'obtenir des vins souples. Mais il n'est pas certain que la généralisation systématique de ce principe soit la meilleure solution ; probablement dans certains cas, notamment en fonction des conditions climatiques et de la maturation du raisin, il serait préférable de modifier ces conditions.

C'est là d'ailleurs une remarque générale et, dans tous les domaines, l'empirisme ne permet pas de prévoir les cas particuliers ; l'intervention de l'expérimentation scientifique est alors indispensable.

Il faut noter que justement, dans le cas des composés phénoliques, le praticien pourrait intervenir efficacement et simplement en jouant par exemple sur la durée de cuvaïson, sur l'éraflage, sur le chauffage de la vendange... S'il ne le fait pas, c'est parce que les connaissances scientifiques actuelles sur ce sujet sont trop limitées et ne permettent pas de prévoir les interventions nécessaires.

Le rôle des composés phénoliques sur la qualité des vendanges rouges est au moins aussi grand que celui des sucres ou des acides, mais la connaissance de leurs propriétés et de leur intervention en œnologie est beaucoup moins avancée ; c'est uniquement pour cela que la technique œnologique ne leur donne pas l'importance qu'il devrait avoir en raison de leurs propriétés.

On voit donc à quel point une meilleure connaissance scientifique de ce sujet difficile serait susceptible d'apporter des applications pratiques.

SUMMARY

DISCUSSION AND APPLICATION OF MODERN METHODS OF DETERMINING THE ANTHOCYANINS
AND TANINS CONTENT OF WINE

In the first part the authors discuss and compare the methods for the quantitative determination of anthocyanins and tanins contents published about fifteen years ago in the Soviet Union and those developed recently at Bordeaux.

The second part is devoted to the application of these methods. In the course of red vinification, the amount of tanins and anthocyanins increases during the first few days of maceration and then decreases.

Heating increases the colour intensity and improves the dissolution of the anthocyanins, but this benefit disappears during aging; after several years, a wine from a heated vintage has practically the same colour as a wine from a non-heated vintage.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BATE-SMITH E. C., 1954. *Adv. Food Res.*, Vol. V, Academic Press, New York.
- DEIBNER L., 1952. *Ann. Technol. agric.*, **3**, 345.
- DOURMICHIDZÉ S. V., 1948. *Biokhimiya, S.S.S.R.*, **13**, 16.
- DOURMICHIDZÉ S. V., 1955. *Tanins et anthocyanes des raisins et des vins*, Académie des Sciences d'U.R.S.S. Moscou.
- DOURMICHIDZÉ S. V., KHATCHIDZÉ O., 1952. *Vinodelié i vinogradarstvo*, **1**, 18.
- ESAU P., 1959. *Amer. J. Enol.*, **10**, 20.
- FERRE L., 1957. *Traité d'Œnologie bourguignonne*, Institut national Appellations d'origine, Paris.
- GUÉRASSIMOV M., 1959. *Technologie du vin*, Pichtépromizdat, Moscou.
- JAULMES P., 1952. *Analyse des vins*, Poulain, Montpellier.
- RIBÉREAU-GAYON J., 1933. *Contribution à l'étude des oxydations et des réductions dans les vins*, 2^e éd., Delmas, Bordeaux.
- RIBÉREAU-GAYON J., MAURIÉ A., 1942. *Bull. Int. Vin*, **15**, 60.
- RIBÉREAU-GAYON J., PEYNAUD E., 1958. *Analyse et Contrôle des vins*, Béranger, Paris.
- RIBÉREAU-GAYON P., 1953. *C. R. Acad. Agric.*, **39**, 800.
- RIBÉREAU-GAYON P., 1959. *Recherches sur les anthocyanes des végétaux. Application au genre Vitis*, Librairie générale de l'Enseignement, Paris.
- RIBÉREAU-GAYON P., 1964. *Les composés phénoliques du raisin et du vin*. Institut national de la Recherche agronomique, Paris.
- RIBÉREAU-GAYON P., STONESTREET E., 1965 a. *Bull. Soc. chim.* p. 2649.
- RIBÉREAU-GAYON P., STONESTREET E., 1965 b. *Deutsche Lebensmittel Rundschau* (à paraître).
- RIBÉREAU-GAYON P., STONESTREET E., 1965 c. *Chim. anal.* (à paraître).
- SUDRAUD P., 1958. *Ann. Technol. agric.*, **7**, 203.
- SUDRAUD P., 1964. *Étude expérimentale de la vinification en rouge*. Institut national de la Recherche agronomique, Paris.
- SWAIN T., HILLIS W. E., 1959. *J. Sci. Food Agric.*, **1**, 63.
- WILLIAMS V., TARANOVA R., 1950. *Vinodelié i Vinogradarstvo, S. S. S. R.*, **4**, 29.
- WILLIAMS V., TARANOVA R., 1951. *Vinodelié i Vinogradarstvo, S. S. S. R.*, **7**, 16.

RECHERCHES SUR LA SÉPARATION DES DINITROPHÉNYLHYDRAZONES DES ACIDES CÉTONIQUES DES JUS DE RAISIN ET DES VINS AU MOYEN DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE CELLULOSE EN VUE DE LEUR DOSAGE ÉLECTROPHOTOMÉTRIQUE

L. DEIBNER et Mireille CABIBEL-HUGUES

*Station centrale de Technologie des Produits végétaux,
Narbonne (Aude)*

SOMMAIRE

Le dosage des acides cétoniques dans les jus de raisin et les vins présente un grand intérêt scientifique et pratique.

De rares procédés existants effectuent la séparation de ces acides, isolés sous forme de dinitrophénylhydrazones, au moyen de la chromatographie de partage sur papier. Or, les techniques de séparation et d'élution employées ne sont pas encore parfaites et nécessitent par conséquent des améliorations.

Dans ces conditions, il est apparu utile d'entreprendre des recherches systématiques concernant l'utilisation de la chromatographie sur couche mince simple et à double développement. Les résultats obtenus ont permis de mettre au point le mode opératoire rendant le dosage électrophotométrique des acides pyruvique et α -cétoglutarique plus précis. La valeur analytique de deux procédés de séparation comparés a été contrôlée par le calcul statistique.

I. — INTRODUCTION

L'un de nous (DEIBNER, 1959, 1963) a déjà signalé l'importance œnochimique des acides cétoniques et, en particulier, des acides pyruvique et α -cétoglutarique, identifiés et dosés pour la première fois par EGOROV et BORISSOVA (1955, 1956, 1957) suivant la technique modifiée de CAVALLINI, FRONTALI et TOSCHI (1949 *a*, *b*) et de CAVALLINI et FRONTALI (1954). Ces auteurs ont utilisé le procédé de CASE (1932) pour l'isolement des acides cétoniques sous forme de 2,4-dinitrophénylhydrazones, séparées ensuite par la chromatographie de partage sur papier, et la réaction colorée de ces dernières, en présence d'une solution d'hydroxyde de sodium, trouvée par JOWETT et QUASTEL (1937), en mettant à profit les enseignements d'autres travaux

(LU, 1939 ; BUEDING, WORTIS, 1940 ; LONG, 1942 ; FRIEDMANN, HAUGEN, 1943). En France, la présence des acides pyruviques et α -cétoglutarique dans les moûts de raisin et les vins a été constatée par BLOUIN et PEYNAUD (1963 ; BLOUIN, 1964).

Quelle est l'origine de ces acides dans les vins ? Tout d'abord, ils se trouvent naturellement dans le raisin, comme l'a montré pour l'acide pyruvique RODOBOULO (1960). Nous avons constaté la présence des acides pyruvique et α -cétoglutarique dans le raisin au cours de sa maturation (DEIBNER, CABIBEL-HUGUES, 1964 *a*), dans le jus ; ils apparaissent en plus grande quantité après la fermentation alcoolique (DEIBNER, CABIBEL-HUGUES, 1964 *b*). La désamination oxydative des aminoacides en présence des substances polyphénoliques est responsable de l'enrichissement des vins en ces acides pendant la maturation ou pendant le traitement thermique des vins (PETROSSIAN, 1963 ; KAZUMOV, 1963). Il est indéniable que l'étude des acides cétoniques des vins présente un grand intérêt. En particulier, leur dosage mérite d'être simplifié et amélioré. Dans ces conditions, il nous a paru utile d'apporter à la technique d'EGOROV et BORISSOVA un certain nombre de modifications. Tout d'abord, nous avons cherché à remplacer la chromatographie sur papier par la chromatographie ascendante sur couche mince de cellulose en tenant compte de la réussite de la séparation des anthocyanes du raisin et du vin à l'aide du même procédé (DEIBNER, BOURZEIX, CABIBEL-HUGUES, 1964). D'ailleurs, on sait actuellement que la chromatographie sur couche mince effectue une plus rapide et meilleure séparation des α -cétoacides par rapport à la chromatographie sur papier (DANCIS, HUTZLER, LEVITZ, 1963) et que la cellulose assure une meilleure reproductibilité des Rf comparativement au gel de silice (BRODASKY, 1964).

II. — RECHERCHES SUR LA SÉPARATION DES ACIDES CÉTONIQUES, ISOLÉS SOUS FORME DE DINITROPHÉNYLHYDRAZONES, PAR CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE DE CELLULOSE SUIVIE DE LEUR DOSAGE ÉLECTROPHOTOMÉTRIQUE APRÈS ÉLUTION

Dans ce qui suit seront exposés successivement les résultats obtenus à la suite de l'application de la chromatographie sur couche mince de cellulose, simple ou multiple, à la séparation des acides pyruvique (propanone-2-oïque) et α -cétoglutarique (pentanone-2-dioïque).

A. — TECHNIQUE DE DOSAGE UTILISANT LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE A UN SEUL DÉVELOPPEMENT

a) *Étude du mode opératoire*

En prenant comme base de départ le procédé de dosage des cétoacides dans les vins établi par EGOROV et BORISSOVA, nous avons apporté à ce mode opératoire un certain nombre de transformations importantes que nous précisons brièvement.

Tout d'abord, il a été constaté qu'une prise d'essai de 10 ml de vin convient en principe pour

les teneurs comprises entre 10 et 75 mg par litre, mais qu'elle est insuffisante pour les quantités plus faibles, d'où la nécessité de la porter à 20 ml. Comme nous le verrons, la prise d'essai de 10 ml devient insuffisante déjà à partir des teneurs de l'ordre de 20-25 mg par litre pour chaque acide.

Ensuite les essais ont montré que l'extraction des 2,4 dinitrophénylhydrazones par l'oxyde d'éthyle est facilitée par l'addition de quelques gouttes de détergent du type Teepol qui fait disparaître des émulsions excessivement gênantes.

À côté de ces modifications, l'emploi de la chromatographie sur couche mince de cellulose (1 mm) apparaît comme une transformation importante introduisant le développement ascendant au lieu de celui descendant. À cette occasion nous avons largement utilisé les enseignements de notre précédent travail concernant la séparation des anthocyanes à l'aide de la même technique, (DEIBNER, BOURZEIX, CABIBEL-HUGUES, 1964). L'avantage principal de la chromatographie sur couche mince est de diminuer considérablement la durée du développement : 3 heures au lieu de 7-8 heures nécessaires pour la chromatographie sur papier. Le mélange chromatographique : *n*-butanol:éthanol:eau (40:10:50) permet d'obtenir une séparation convenable, sans plus. Voici les *R_f* moyens des acides, donnés à titre indicatif, car les valeurs ne sont pas parfaitement reproductibles :

Acide α -cétoglutarique.....	0,48
Acide pyruvique.....	0,56
Isomère de l'acide pyruvique.....	0,62

Dans nos conditions, l'excès de 2,4 dinitrophénylhydrazine, dont la plus grande partie est éliminée au cours des lavages avec l'oxyde d'éthyle, s'accumule dans la partie supérieure de la chromatoplaque, ce qui nous a évité d'utiliser du formol, préconisé par CAVALLINI et MANDONI (1957) pour éliminer son effet perturbateur. En principe, l'acide oxalacétique se place tout de suite après l'acide α -cétoglutarique. Nous n'avons pas décelé sa présence dans les vins. Fait curieux, SUBOLEVA (1962) a constaté, en utilisant la technique d'EGOROV et BORISSOVA, que l'acide oxalacétique est plus près de la ligne de départ que l'acide α -cétoglutarique.

Au cours du développement chromatographique l'influence de la température est très importante, car l'amplitude de ses modifications possibles est bien minime, 3°C, de — 18° à 21°C. Cela veut dire qu'il est indispensable de travailler à température de 20°C $\pm$ 1°C.

La facilité d'élution des taches de dinitrophénylhydrazones constitue un autre avantage considérable de la chromatographie sur couche mince. En effet, il est très aisé de gratter la surface de cellulose correspondant à une tache et de traiter la poudre obtenue par 4 ml de solution normale d'hydroxyde de sodium et ensuite de filtrer le liquide rouge dans un tube d'Allihn dont la plaque poreuse (n° 2) est recouverte d'une rondelle de papier-filtre. Une telle filtration, préconisée par EL HAWARY et THOMPSON (1953), est plus rapide que la centrifugation, ce qui est très important pour notre mode opératoire préconisant le dosage électrophotométrique cinq minutes après l'addition de la solution d'hydroxyde de sodium.

En ce qui concerne les deux taches correspondant à deux isomères de l'acide pyruvique, elles doivent être prises ensemble, d'autant plus que l'isomère énolique de la 2,4 dinitrophénylhydrazone de l'acide pyruvique est présent en quantité peu élevée, de l'ordre de 4,5 p. 100 de la quantité totale de l'acide.

Nous avons adopté, comme durée pour la formation de la coloration rouge, la période de 5 minutes. EGOROV et BORISSOVA effectuent le dosage spectrophotométrique 45 minutes après l'addition de la solution alcaline. CAVALLINI et FRONTALI (1954) attendent 10 minutes avant de procéder à la centrifugation. En général, le délai d'attente est de 5-10 ou 15 minutes, (FRIEDMANN, HAUGEN, 1943 ; KOESELL, SHARPE, 1952 ; EL HAWARY, THOMPSON, 1953). Dans les conditions de notre mode opératoire, l'affaiblissement de la coloration rouge brun n'a pas été observée. D'après LONG (1942), la diminution de la coloration se produit, si le volume de la solution d'hydroxyde de sodium est insuffisante, de l'ordre de 3 ml ; la stabilité pendant 90 minutes est acquise, si le volume du réactif est de 6 ml (LU 1939 ; BUEDING, WORTIS, 1940) ; pour KUN et GARCIA-HERNANDEZ (1957) la couleur est stable pendant 2 heures, si l'on utilise la solution alcaline normale. Nous avons conservé l'emploi de cette concentration. On sait depuis les travaux d'ISHERWOOD et CRICKSHANK (1954) que les absorptions spectrales de deux stéréoisomères des dinitrophénylhydrazones de l'acide pyruvique sont d'autant plus différentes que les concentrations des solutions alcalines s'écartent de la concentration 1,5 N. D'après CAVALLINI et FRONTALI (1954), l'erreur commise est minime, si l'on effectue le dosage spectrophotométrique du mélange de deux isomères à la même longueur d'onde.

Les maximums d'absorption lumineuse pour les dinitrophénylhydrazones des acides pyruvique et α -cétoglutarique en solution alcaline sont comprises entre 400 et 450 nanomètres, suivant les différents auteurs, comme le montre le tableau 1.

Nous avons choisi le filtre Lumetron caractérisé par le maximum d'absorption à 420 nanomètres. Bien entendu, l'emploi d'un spectrophotomètre à monochromateur améliore les résultats du dosage.

L'exposé détaillé du mode opératoire établi sera donné dans un mémoire spécial (DEIBNER, CABIBEL-HUGUES, 1966).

TABLEAU I

Sources	Acide pyruvique		Acide α -ceto- glutarique
	1 ^{er} isomère	2 ^e isomère	
FRIEDMANN, HAUGEN (1943)	420	—	400
EL HAWARY, THOMPSON (1953)	440-450	—	425
CAVALLINI, FRONTALI (1954)	440	420	400
EGOROV, BORISSOVA (1955, 1956, 1957)	440	420	400
PETROSSIAN (1963)	440	—	401

b) Étude statistique de la technique utilisée

La valeur analytique de la technique utilisé pour le dosage des acides pyruvique et α -cétoglutarique a été contrôlée par le calcul statistique.

1^o Évaluation de la fidélité.

Le terme fidélité désigne le degré de reproductibilité qui est fonction des erreurs accidentelles. Nous l'avons évalué pour les résultats des dosages de ces deux acides dans un vin rouge de Corbières, après une séparation chromatographique très bonne, ce qui ne se produit pas assez souvent. Les prises d'essais étaient de 10 ml de vin et 50 μ l pour la chromatographie.

a) Acide α -cétoglutarique.

Les résultats individuels obtenus sont les suivants (en mg par litre) :

64,8 ; 60,8 ; 64,8 ; 60,8 ; 62,4 ; 56,0 ; 64,8 ; 60,8 ; 62,4 ; 60,8 ;

leur moyenne $\bar{x}$ étant égale à 61,84.

En partant de ces données, on calcule la variance v , l'écart type σ et l'écart moyen σ_m , à savoir :

la variance $v = \frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1} = 8,14$

l'écart type $\sigma = \sqrt{v} = 2,85$

l'écart moyenne $\sigma_m = 0,89$.

Pour une probabilité de $P = 0,05$ et pour $N = 9$, la table de Fischer donne pour le coefficient

$t = 2,262$.

Par conséquent, chaque résultat a 95 p. 100 de chances de se trouver dans les limites

$\bar{x} \pm \sigma t = 61,84 \pm 6,44$

soit entre les limites 68, 28 et 55,40.

Comme nous pouvons le constater, il n'y a aucun résultat aberrant.

Il s'ensuit que la fidélité des mesures est égale en valeur relative à :

$\frac{\sigma t \times 100}{\bar{x}} = \frac{6,44 \times 100}{61,84} = \pm 10,4 \text{ p. } 100$.

Quant au résultat moyen, sa reproductibilité en valeur relative est de :

$\frac{\sigma_m t \times 100}{\bar{x}} = \frac{2,01 \times 100}{61,84} = \pm 3,2 \text{ p. } 100$.

b) *Acide pyruvique.*

Voici les résultats individuels obtenus ainsi que leur moyenne exprimée en mg par litre :

30,4 ; 30,4 ; 30,4 ; 30,4 ; 33,6 ; 28,0 ; 30,4 ; 28,0 ; 28,0 ; $\bar{x} = 29,95$.

Comme précédemment on calcule les paramètres statistiques et on obtient pour la variance v 3,21, pour l'écart type σ 1,80 et pour l'écart moyen σ_m 0,60. Pour une probabilité de $P = 0,05$ et $N = 8$, on a $t = 2,306$. Finalement, les résultats doivent se trouver dans les limites suivantes : 34,10 et 25,80. La fidélité d'un résultat isolé est, en valeur relative, de $\pm 13,0$ p. 100. Quant à la fidélité du résultat moyen, elle est de $\pm 4,6$ p. 100.

2° *Conclusion.*

Il s'ensuit de l'étude statistique effectuée que tout résultat obtenu dans un meilleur cas peut être déterminé avec une reproductibilité égale à ± 10 -13 p. 100 pour des teneurs de chaque acide comprises entre 30 et 80 mg par litre et que le résultat moyen est connu avec une fidélité meilleure : 3-4,5 p. 100.

D'autres essais ont montré que des séparations chromatographiques moins bonnes des dinitro-phénylhydrazones des cétoacides, beaucoup plus fréquentes que de bonnes séparations, déterminent des erreurs relatives de l'ordre de ± 30 p. 100 et que pour le résultat moyen une erreur relative est de $\pm 7,4$ p. 100 à condition d'avoir des teneurs en cétoacides de l'ordre de 40-50 mg par litre pour chaque acide. Pour des teneurs inférieures à 10 mg par litre, les erreurs correspondantes peuvent atteindre 95 p. 100 et 23-24 p. 100 respectivement. Dans le cas de quantités si faibles d'acides, il est nécessaire de doubler ou tripler la prise d'essai des vins.

B. — TECHNIQUE DE DOSAGE UTILISANT LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE A DEUX DÉVELOPPEMENTS SUCCESSIFS

Il a été constaté à la suite de nombreux essais effectués pendant plusieurs mois que le solvant chromatographique ternaire : *n*-butanol:éthanol:eau (40:10:50), préconisé par CAVALLINI, FRONTALI, TOSCHI (1949, 1954) et utilisé par EGOROV et BORISSOVA (1955), ne possède pas un grand pouvoir séparateur sur la couche mince de cellulose. Cette circonstance nous a amené à faire appel à la chromatographie multiple (JEANES, WISE, DIMLER, 1951) qui précédemment nous a permis d'obtenir une bonne séparation des anthocyanes du raisin et du vin (DEIBNER, BOURZEIX, CABIDEL-HUGUES, 1964).

a) *Étude du mode opératoire*

Intéressés par la réussite de la séparation des cétoacides du tabac par chromatographie ascendante radiale sur papier à l'aide de plusieurs solvants et, en particulier, par le mélange binaire *n*-butanol-hydroxyde d'ammonium (7:1), obtenue par ASMAEV et MOKHNATCHEV (1960), nous avons utilisé ce dernier comme deuxième solvant à la suite du solvant habituellement utilisé, c'est-à-dire le solvant ternaire, *n*-butanol:éthanol:eau (40:10:50).

Voici les résultats obtenus en ce qui concerne les R_f moyens des cétoacides.

TABLEAU 2

*Rf des dinitrophénylhydrazones des acides cétoniques séparés
par la chromatographie multiple en couche mince*

Premier solvant : *n*-butanol:éthanol:eau (40:10:50)
Deuxième solvant : butanol:hydroxyde d'ammonium (7:1).

Acide	1 ^{er} solvant	2 ^e solvant
α -cétoglutarique	0,48	0,58
Pyruvique	0,56	0,75
Acide pyruvique isomère ...	0,62	0,90

La durée d'ascension pour chaque solvant chromatographique est de 3 et 2 h respectivement. La séparation des acides sous forme de dinitrophénylhydrazones est très satisfaisante. Fait curieux, le deuxième solvant employé tout seul ne donne aucune séparation au bout de 2 h. Nous n'avons pas remarqué la destruction des dinitrophénylhydrazones de l'acide pyruvique dans ce solvant sous l'action de l'hydroxyde d'ammonium employé pour l'extraction des dinitrophénylhydrazones. Par contre, les essais effectués par ISHERWOOD et CRUICKSHAND (1954) qui ont observé cette décomposition, ont duré 12 h et le solvant chromatographique employé contenait 30 p. 100 en volume d'hydroxyde d'ammonium concentré (environ 3,4 N).

b) *Étude statistique de la technique utilisée*

Comme précédemment, la valeur analytique de la technique a été contrôlée par le calcul statistique des résultats obtenus pour un vin rouge de Corbières. Les prises d'essai étaient de 10 ml de vin et 50 μ l pour la chromatographie.

1° *Évaluation de la fidélité.*

α) *Acide α -cétooglutarique.*

Les résultats individuels obtenus, ainsi que leur moyenne exprimés en mg par litre, sont les suivants :

$$42,4 ; 42,4 ; 44,0 ; 44,0 ; \bar{x} = 43,2.$$

Malgré le nombre des résultats inférieur à 5, nous avons effectué le calcul statistique.

Les valeurs des paramètres statistiques sont les suivants : la variance — 0,85, l'écart-type — 0,29, l'écart moyen — 0,145. Finalement, les résultats des mesures ont 95 p. 100 de chances de se trouver dans les limites comprises entre 44,12 et 44,28. La fidélité pour un résultat isolé est de ± 2 p. 100, mais le résultat moyen est connu avec une fidélité de ± 1 p. 100.

β) *Acide pyruvique.*

Les résultats individuels obtenus pour l'ensemble des deux isomères en mg par litre, sont les suivants :

$$20,0 ; 17,6 ; 22,4 ; 20,0 ; \bar{x} = 20,0.$$

On a obtenu pour la variance — 3,84, pour l'écart-type — 1,95, pour l'écart moyen — 0,975. Les résultats doivent se trouver dans les limites comprises entre 13,80 et 26,20. La fidélité d'un résultat isolé est, en valeur relative, de ± 31 p. 100 et pour le résultat moyen de 15,5 p. 100.

Il est nécessaire, pour améliorer la fidélité, d'augmenter la prise d'essai de vin. En doublant ce dernier (20 ml au lieu de 10), la fidélité d'un résultat isolé devient $\pm 15,5$ p. 100 et celle de la valeur moyenne $\pm 7,7$ p. 100, comme l'ont montré les dosages effectués.

2° *Conclusion.*

La technique de chromatographie multiple, à deux développements, produit des séparations de dinitrophénylhydrazones des acides cétoniques d'une manière plus régulière et plus constante par rapport à la technique initiale à un seul développement. Cette circonstance est favorable à la fidélité des résultats, laquelle pour un résultat isolé est comprise entre $\pm 2-15$ p. 100, tandis que celle de la technique à un développement peut osciller dans des limites plus larges $\pm 10,7-30$ p. 100.

En même temps on a constaté que la prise d'essai de 10 ml n'est pas suffisante pour les teneurs de 20-25 mg de chaque acide par litre, puisque dans ce cas la fidélité est de ± 32 p. 100 pour un résultat isolé. Il est facile de remédier à cette insuffisance en doublant la prise d'essai et, s'il le faut, en portant le volume chromatographique de 0,05 ml à 0, 1 ml.

C. — ÉTUDE STATISTIQUE COMPARATIVE DES DEUX TECHNIQUES CHROMATOGRAPHIQUES A UN ET DEUX DÉVELOPPEMENTS

Afin de compléter et vérifier les conclusions du calcul statistique appliqué aux résultats du dosage de deux cétoacides dans les vins, nous avons effectué l'étude statistique des résultats du dosage de ces deux acides en solution aqueuse. Dans

ces conditions il est possible d'apprécier l'influence d'autres composants du vin sur la fidélité des résultats.

Les solutions des acides, contenant soit 50 mg de chaque acide, soit 20 mg dans un litre d'eau, ont été préparées par dilution d'une solution-mère contenant 500 mg de chaque acide par litre. Comme produits de référence, nous avons utilisé les acides pyruvique et α -cétoglutarique de qualité *purissima* (Société Fluka, Suisse) con-

TABLEAU 3

Solution à 50 mg d'acide α -cétoglutarique et 50 mg d'acide pyruvique par litre

Prise d'essai : 10 ml ; volume chromatographique : 50 μ l. Résultats en mg par litre.

Technique à un solvant		Technique à deux solvants	
α -cétoglutarique	pyruvique	α -cétoglutarique	pyruvique
46,4	57,6	42,4	47,2
46,4	47,2	46,4	44,8
46,4	50,4	44,8	47,2
44,8	52,0	46,4	50,4
51,2	47,2		
51,2	60,0		
53,6	54,4		
51,2	60,0		
56,0			
$\bar{x}$ 49,6	53,6	45,0	47,4

TABLEAU 4

Solution contenant 20 mg d'acide α -cétoglutarique et 20 mg d'acide pyruvique par litre

Prise d'essai : 10 ml ; volume chromatographique : 50 μ l. Résultats en mg par litre.

Technique à un solvant		Technique à deux solvants	
α -cétoglutarique	pyruvique	α -cétoglutarique	pyruvique
19,2	12,0	22,4	9,6
26,4	11,2	14,4	15,2
23,2	9,6	12,0	17,6
19,2	9,6	14,4	10,0
14,4	17,6	14,4	17,6
16,8	22,4	14,4	20,8
14,4	17,6		
16,8	17,6		
14,4	12,0		
14,4	15,2		
14,4	15,2		
14,4	15,2		
	15		
	15,2		
$\bar{x}$ 17,4	14,6	15,3	15,1

servés de 0° à 20°C. La prise d'essai et le volume chromatographique étaient 10 ml et 50 μ l respectivement.

Les résultats obtenus sont consignés dans les tableaux 3 et 4. Le tableau 5 résume les résultats statistiques obtenus pour deux acides et pour deux solutions expérimentées après l'élimination des résultats aberrants.

TABLEAU 5

Comparaison des résultats statistiques pour deux techniques.
(Fidélité en % $\pm$)

Nature des résultats	Solution à 50 mg				Solution à 20 mg			
	Technique 1		Technique 2		Technique 1		Technique 2	
	α -céto- glutarique	pyru- vique	α -céto- glutarique	pyru- vique	α -céto- glutarique	pyru- vique	α -céto- glutarique	pyru- vique
Résultat isolé ...	17,8	23,3	13,2	15,4	50,9	55,0	55,3	76,4
Valeur moyenne.	5,9	8,7	6,6	7,7	14,6	15,1	22,4	31,0

Il ressort de l'examen comparatif des données des tableaux 3 et 5, que pour les teneurs de 50 mg par litre pour chaque acide la fidélité de la technique à deux développements est supérieure à celle d'un seul développement, moins favorable à l'acide pyruvique ; la première technique fournit les résultats plus nets, moins dispersés, grâce à une meilleure séparation, mais inférieurs à la réalité. Par contre, pour les teneurs de 20 mg par litre, les deux techniques sont peu fidèles (voir les tabl. 4 et 5). On peut dire que les résultats de dosage sont mauvais pour les teneurs inférieures à 30 mg par litre pour chaque acide, d'où l'obligation, déjà signalée précédemment, d'augmenter la prise d'essai, et au besoin, le volume de la prise chromatographique.

III. — CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Les recherches effectuées ont démontré que la chromatographie sur couche mince de cellulose assure une bonne séparation des dinitrophénylhydrazones des acides pyruvique et α -cétoglutarique, surtout si l'on fait appel à la technique utilisant le double développement chromatographique, ce qui améliore l'opération d'élution et la fidélité des résultats du dosage spectrophotométrique. En effet, il ressort de l'étude statistique effectuée que dans le cas de la technique à un seul développement un résultat isolé peut être déterminé avec une reproductibilité de l'ordre de $\pm$ 10-30 p. 100 et que le résultat moyen peut être connu, avec une précision de 4,5-7,5 p. 100. Par contre, la fidélité des résultats obtenus au moyen de la

technique à double développement est deux fois supérieure, à savoir $\pm 2-15$ p. 100 pour un résultat isolé et de $\pm 1-8$ p. 100 pour le résultat moyen.

Les enseignements acquis ont permis d'établir un mode opératoire de dosage électrophotométrique des acides pyruvique et α -cétoglutarique dans les jus de raisin et le vin, décrit dans un mémoire spécial (DEIBNER, CABIBEL-HUGUES, 1966).

Reçu pour publication en mai 1965.

SUMMARY

INVESTIGATIONS ON THE SEPARATION OF THE DINITROPHENYLHYDRAZONES FROM THE CETONIC ACIDS IN GRAPE JUICES AND WINES, BY CELULOSE THIN LAYER CHROMATOGRAPHY, WITH THE PURPOSE OF THEIR DOSAGE BY ELECTROPHOTOMETRY

The investigations concerning the dosage of alphacetoglutaric and pyruvic acids in grape juices and wines, according to the method of EGOROV and BORISSOVA, which is an œnochemical adaptation of the CAVALLINI-FRONTALI and TOSCHI method, gave way to the establishment of a procedure using the ascending simple or multiple thin-layer chromatography on cellulose which improved notably the separation and the elution of the dinitrophenylhydrazones of these acids. In that way, the electrophotometric dosage, based on the coloured reaction between the dinitrophenylhydrazones and the sodium hydroxide solution, was rendered more precise, as was proved by the statistical data applied to the results obtained.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ASMAËV P., MOKHNATCHEV G., 1960. Séparation et identification des cétoacides du tabac au moyen de la chromatographie sur papier (en russe). *Izv. Vysch. Oulch. Zav. Pisch. Tech. (Bull. Éc. sup. tech. Alim)*, n° 5, 160-164.
- BLOUIN J., PEYNAUD E., 1963. Présence constante des acides pyruvique et α -cétoglutarique dans les moûts de raisin et les vins. *C. R. Acad. Sci. Paris*, **256**, 4521-4523.
- BLOUIN J., 1964. Application des méthodes enzymatiques optiques au dosage de certains constituants des boissons. *Chim. Anal.*, **46**, n° 10, 513-523.
- BRODASKY T., 1964. Reproducibility of Rf and correlation of chromatographic patterns on paper and thin layer plates. *Anal. Chem.*, **36**, 996-999.
- BUEDING E., WORTIS 1940. The stabilization and determination of pyruvic acid in the blood. *J. Biol. Chem.*, **133**, 585.
- CASE E., 1932. XCI. The determination of pyruvic acid. *Biochem. J.* **26**, 753-758.
- CAVALLINI D., FRONTALI N., TOSCHI G., 1949 a. Determination of ketoacids by partition chromatography on filter paper. *Nature*, (London), **163**, 568-569.
- CAVALLINI D., FRONTALI N., TOSCHI G., 1949 b. Ketoacid content of human blood and urine. *Nature* (London), **164**, 792-793.
- CAVALLINI D., FRONTALI N., 1954. Quantitative determination of ketoacids by paper partition chromatography. *Biochem. Biophys. Acta.*, **13**, n° 3, 439-445.
- CAVALLINI D., MANDOVİ B., 1957. The use of formaldehyde to avoid artefacts in the chromatographic determination of ketoacids. *Chim. Acta.*, **2**, 312-315.
- CORDIER P., 1964. Importance et aptitude réactionnelle des acides α -cétoniques. *Ann. Pharm. Fr.*, **22**, 225-241.
- DEIBNER L., 1959. L'anhydride sulfureux et l'ion sulfurique dans les vins et les jus de raisin. Différentes méthodes de leur évaluation quantitative. Exposé d'une technique synchronisant le dosage de ces composés, par iodomètre et gravimètre. (Technique DEIBNER-BÉNARD), *Revue Ferm. Ind. Alim.*, Bruxelles, **14**, n° 5 179-186, n° 6, 227-250.
- DEIBNER L., 1963. État actuel de nos connaissances sur les acides cétoniques des vins. *Ann. Technol. agric.*, **12**, 229-233.

- DEIBNER L., BOURZEIX M., CABIBEL-HUGUES Mireille, 1964. Séparation des anthocyanes diglucosides par chromatographie sur couche mince et leur dosage spectrophotométrique. *Ann. Technol. agric.* **13**, 359-375.
- DEIBNER L., CABIBEL-HUGUES Mireille, 1964 a. Évolution de quelques éléments constitutifs dans le grain de raisin au cours de la maturation. II. Acides cétoniques. *Revue Ferment. Ind. Alim.*, Bruxelles, **19**, 144-146.
- DEIBNER L., CABIBEL-HUGUES Mireille 1964 b. Évolution de quelques éléments constitutifs dans le moût de raisin rouge au cours de sa fermentation alcoolique ainsi que dans le vin obtenu. II. Acides cétoniques. *Revue Ferment. Ind. Alim.* Bruxelles, **19**, 208-209.
- DEIBNER L., CABIBEL-HUGUES Mireille, 1965 a. Modifications de quelques éléments constitutifs des vins doux naturels au cours de leur traitement thermique prolongé à l'abri de l'air. II. Acides α -cétoniques. *Ind. Alim. Agric.*, **82**, 15-16.
- DEIBNER L., CABIBEL-HUGUES Mireille, 1966. Dosage électrophotométrique des acides pyruvique et α -cétoglutarique dans les jus de raisin et les vins après séparation de leurs dinitrophénylhydrazones au moyen de la chromatographie sur couche mince de cellulose. *Ann. Technol. agric.* (à paraître).
- EL HAWARY M., THOMPSON R., 1953. Séparation and estimation of blood ketoacids by paper chromatography. *Biochem. J.*, **59**, 340-347.
- EGOROV I., BORISSOVA N., 1955. Séparation et dosage des cétoacides dans le vin (en russe). *Doklady Akad. Nauk.*, U. R. S. S., **104**, 433-435.
- EGOROV I., BORISSOVA N., 1956. Dosage des cétoacides dans le vin (en russe) *Vinod. i Vinograd.* U. R. S. S. n° 2, 23-25.
- EGOROV I., BORISSOVA N., 1957. Séparation et dosage des cétoacides dans le vin par la méthode de la chromatographie de partage sur papier (en russe). *Biochimiya Vinod.*, n° 5, 253-258, Ac. Sci. U. R. S. S., Moscou.
- FRIEDMANN Th., HAUGEN G., 1943. Pyruvic acid. II. The determination of ketoacids in blood and urine. *J. Biol. Chem.*, **147**, 415-442.
- ISHERWOOD F., CRUICKSHANK D., 1954. Chromatographic separation and analysis of mixtures of pyruvic, oxalacetic and α -ketoglutaric acids. *Nature (London)* **173**, 121-122.
- JEANES A., WISE C., DIMLER R., 1951. Improved techniques in paper chromatography of carbohydrates. *Anal. Chem.*, **23**, 415-420.
- JOWETT M., QUASTEL J., 1937. XXXIX Effect of hydroxylmalonate on the metabolism of brain. *Biochem. J.*, **31**, 275-281.
- KAZUMOV N., 1963. Rôle des substances azotées et les produits de leur réaction au cours du chauffage du vin (en russe). *Prom. Armenii, Sov. Nar. Khoz. Arm. S.S.R Tekhn. Ekon. Bull.* (Industrie Arm. Agric. Sov. Rép. Arménie, Bull. Techn. Econ.) **6**, n° 7, 54-58 (d'après *Chem. Abst.* 1963, **60**, n° 12, 15099 c).
- KOEPSSELL H., SHARPE E., 1952. Microdetermination of pyruvic and α -cétoglutaric acids. *Arch. Biochem. Biophys.* **38**, 443-449.
- LONG C., 1942. A general method for the estimation of α -ketoacids and its application to *d*-ketoacid metabolism in pigeon brain. *Biochem. J.*, **36**, 807-814.
- LU G., 1939. XXX. Studies on the metabolism of pyruvic acid in normal and vitamin B₁ deficient states. A rapid specific and sensitive method for the estimation of blood pyruvate. *Biochem. J.*, **33**, 249-254.
- MARKMAN A., EL'GORT B., 1962. Dosage polarographique de l'acide pyruvique dans le moût en fermentation et dans les vins (en russe). *Izvestiya Vysch. Outcheb. Zav. Pisch. Prom.* U. R. S. S., n° 6, 128-131.
- PETROSSIAN Tz., 1963. Présence des cétoacides dans l'eau de vie de cognac et sources possibles de leur formation (en russe). *Vinod. i Vinograd.* U. R. S. S., **23**, n° 6, 12-14.
- RODOPOULO A., 1960. Modifications oxydoréductrices des acides organiques au cours de la maturation du raisin (en russe). *Biochimiya Vinodelya*, n° 6, 132-170. Acad. Sc. U. R. S. S., Moscou.
- SHELLARD E., 1964. Rf values in thin layer chromatography. *Lab. Pract.*, **13**, n° 4, 290-294.
- SOBOLEVA G., 1962. Étude des acides organiques du thé (en russe). *Biochimiya tchnainogo proizvodstva* (Biochimie de prod. thé) n° 9, 20-26, Ac. Sci. U. R. S. S., Moscou.
- TOMISEK A., ALLAN Paula., 1964. Water content of paper as a variable in paper chromatography. *J. Chromatogr.*, **14**, 232-237.

ÉTUDE DU DOSAGE DE L'ACIDE ASCORBIQUE DANS LES VINS ET DANS LES JUS FORTEMENT COLORÉS

Andrée OURNAC

Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude)

SOMMAIRE

Au cours du dosage de l'acide ascorbique dans les jus colorés et les vins par la méthode à la dinitrophénylhydrazine de ROE et KUETHER, on se trouve en présence d'un certain nombre de corps interférants qui semblent être constitués principalement par les matières colorantes et taninoïdes.

On va effectuer le dosage après élimination préalable de ces corps par une défécation mercurique.

INTRODUCTION

La méthode de dosage de l'acide ascorbique, de ROE et KUETHER (1943), ROE et OESTERLING (1944) a déjà été utilisée pour les jus de raisin (OURNAC, 1953).

Le principe est le suivant : l'acide ascorbique est oxydé en acide déhydroascorbique et traité par la 2-4 dinitrophénylhydrazine. Une *bis*-2-4 dinitrophénylhydrazone précipite alors dans le milieu en flocons légers, rouges orangés, que l'on solubilise dans l'acide sulfurique. Le dosage se termine photométriquement.

Cette technique appliquée directement aux vins et aux jus très colorés, après une simple dilution, aboutit à un précipité lourd, granuleux, de couleur rouge marron, différent de celui produit par l'acide ascorbique pur.

D'autres corps interfèrent en formant, dans les conditions réalisées, un précipité d'hydrazone.

On remarque :

— que ce précipité marron est d'autant plus abondant que les jus et les vins sont colorés ;

— que les jus et les vins de macération sont très riches en ce précipité, tandis que les jus et les vins de goutte en sont pratiquement dépourvus ;

— que les jus et les vins rouges ne se décolorent pas par l'action du brome, mais présentent après cette oxydation une coloration jaune, d'autant plus accentuée que le jus ou le vin est de couleur plus foncée.

Les corps qui interfèrent semblent :

— soit provenir d'un enrichissement du jus au cours de la macération ou au cours de la fermentation, réalisées en présence des éléments solides du raisin.

Les corps seraient alors des matières colorantes (anthocyanes) et tannoïdes (catéchine) :

— soit se former au cours des transformations chimiques qui se produisent au cours de la fermentation.

On a pu constater que les résultats obtenus en opérant sur le vin directement et sur le vin déféqué étaient différents. Il était donc fondamental d'étudier tout d'abord l'interférence de cette défécation sur le dosage de l'acide ascorbique. Les études correspondantes font l'objet de ce premier mémoire. L'étude du précipité mercurique, par les développements qu'elle a occasionnés fera l'objet d'un deuxième mémoire.

TECHNIQUE EXPÉRIMENTALE

La défécation

On a employé la méthode de défécation mercurique de SÉMICHON et FLANZY (1926).

La défécation par les sels de plomb ne peut être utilisée ici. Elle provoque un entraînement total de l'acide ascorbique du milieu.

La défécation mercurique précède la technique de dosage de l'acide ascorbique déjà exposée (OURNAC, 1953).

Voici le mode opératoire :

— 50 cc de vin ou de jus sont additionnés de 3 à 5 cc de réactif mercurique (sulfate acide de mercure) ;

— on laisse agir 30 mn en agitant plusieurs fois et on filtre.

Dans le cas où le filtrat n'est pas absolument incolore, et limpide, on peut laisser agir le réactif une nuit. On a vérifié que dans ces conditions, l'acide ascorbique ne subissait aucune altération.

— on précipite l'excès de mercure par un courant de SH_2 ;

— en opérant selon les conditions opératoires de SÉMICHON et FLANZY (1926), on ne doit pas être en présence d'un excès de SH_2 . Cependant comme de faibles quantités de SH_2 restant gênent la fin du dosage, on fait passer un courant de CO_2 pour éliminer toute trace de SH_2 (TAVERNIER et JACQUIN, 1946).

— quand SH_2 a disparu, ce que l'on vérifie au moyen de papier imprégné à l'acétate de plomb, on dilue au 1/5 avec une solution d'acide métaphosphorique à 5 p. 100.

Le dosage

— On pratique alors l'oxydation par le Br, puis la précipitation à la dinitrophénylhydrazine selon la technique déjà exposée (OURNAC, 1953).

Les lectures au spectrophotomètre sont effectuées avec la longueur d'onde : 5 300 Å, 10 mn après la sortie du bain de glace pour les témoins, 30 mn à 1 h après, pour les essais. Cette attente permet d'éliminer l'influence des sucres.

En effet, étant donné les conditions opératoires, les sucres précipitent en faible proportion. Ce précipité se décompose dans l'acide sulfurique pendant les 30 premières minutes d'attente et aucune couleur supplémentaire n'apparaît.

Un certain nombre d'essais ont alors été réalisés :

1° *Étude des réactifs.*

On a effectué un dosage avec tous les réactifs utilisés pour la défécation et la précipitation.

2° *Comportement de l'acide ascorbique pur.*

On a considéré des dilutions d'acide ascorbique pur dans un tampon de pH voisin de 3, au bitartrate de potassium. Les dosages étaient effectués simultanément sur les solutions naturelles et sur les solutions ayant subi la défécation.

3° *Dosages comparatifs avec et sans défécation sur des jus et des vins, blancs et rouges, de goutte et de macération.*

Les vins ont été élaborés sans addition d'aucun produit. Une série a été obtenue par fermentation du jus de goutte, une autre par fermentation de la vendange entière. L'acide ascorbique a été dosé quatre mois après la fin de la fermentation.

4° *Dosages sur des vins enrichis en vitamine C.*

On a additionné des vins rouges et blancs de deux doses de vitamine C, 50 et 100 mg par litre et effectué les dosages avec et sans défécation.

5° *Étude du précipité mercurique.*

On a effectué un dosage à la dinitrophénylhydrazine sur le précipité formé après addition au vin du sulfate acide de mercure. On veut voir si la « vitamine C apparente » disparue au cours de la défécation, se retrouve intégralement dans ce précipité.

Voici comment on opère :

— le vin entier est traité au sulfate acide de mercure dans un tube à centrifuger en verre. Après centrifugation, et élimination du liquide clair surnageant, le précipité est repris dans le tube même par de l'alcool éthylique à 45°.

Le précipité étant alors remis en suspension, on fait passer un courant de SH_2 pour précipiter le mercure et on centrifuge à nouveau.

C'est dans ce liquide clair qui renferme les corps insolubilisés par le mercure que l'on procède au dosage.

On chasse l'excès de SH_2 par un courant de gaz carbonique, on élimine l'alcool par évaporation sous vide et on ramène à un volume connu.

On traite alors par le brome, puis par la dinitrophénylhydrazine selon les conditions habituelles du dosage.

RÉSULTATS

1° *Action des réactifs*

Les réactifs seuls ne produisent aucun précipité ni aucune absorption au photolorimètre.

2° *Action de la défécation sur la vitamine C*

L'acide ascorbique se retrouve pratiquement intégralement après défécation mercurique en solution pure.

3° *Étude sur les jus de raisin*

Les résultats relatifs aux dosages réalisés dans les jus avant et après défécation sont réunis dans le tableau 1.

Les résultats sont exprimés en mg d'acide ascorbique total : forme oxydée + forme réduite.

Les jus non déféqués donnent en général une dose d'acide ascorbique plus élevée que les jus déféqués. Les différences apparaissent d'autant plus grandes que le jus est plus coloré.

Pour les jus étudiés la dose de vitamine C oscille entre 30 et 50 mg/l.

TAB^{LEAU} I

Jus de Raisin

	Dosage effectué (mg/l)	
	Sans défécation	Avec défécation
<i>Jus frais de goutte</i>		
Aramon	50	51
Carignan blanc	52,50	53
Carignan rouge	48,00	44
Cinsault	44,00	41
Alicante-Bouschet	52,50	31,8
Terret gris	39,00	39,0

4° *Étude sur les vins*

Les résultats figurent dans le tableau 2.

TAB^{LEAU} 2

Vins

	Dosage effectué (mg./l.)	
	Sans défécation	Avec défécation
Carignan blanc de goutte.....	6,2	6,0
Carignan de macération.....	10,6	6,0
Aramon de goutte	4,4	3,3
Aramon de macération	16,0	3,3
Cinsault de goutte.....	3,0	3,3
Cinsault de macération	11,0	4,8
Carignan rouge de goutte.....	10,7	7,0
Carignan de macération	36,0	9,0
Alicante-Bouschet de goutte.....	21,0	7,0
Alicante de macération.....	48,0	8,0

Les vins non déféqués donnent généralement une quantité d'acide ascorbique plus élevée que les vins déféqués. Alors que cette différence est faible ou négligeable pour les vins issus de jus de goutte de raisin à jus blanc, elle est beaucoup plus importante pour les vins de macération (vins rouges) et d'autant plus que le raisin est coloré.

Dans les vins déféqués les doses sont comprises entre 3 mg et 9 mg par litre. Par contre, dans les vins non déféqués, les doses varieraient de 6 à 48 mg/l.

Étude sur les vins enrichis en acide ascorbique.

Les résultats sont réunis dans le tableau 3.

TABLEAU 3
Vins enrichis en vitamine C

	Dosage effectué			
	Sans défécation		Avec défécation	
	mg. Vit. C/l.	Vitamine retrouvée mg/l.	mg. Vit. C/l.	Vitamine retrouvée mg/l.
<i>Vin blanc</i>				
Vin naturel	6	—	5	—
Vin + 50 mg/l vitamine C	55	49	55	50
Vin + 100 mg/l. vitamine C....	105	99	104,6	99,6
<i>Vin rouge N° 1</i>				
Vin naturel	44,5	—	10	—
Vin + 50 mg/l. vitamine C	94,8	50,3	61	51
<i>Vin rouge N° 2</i>				
Vin naturel	23	—	6,6	—
Vin + 100 mg/l. vitamine C....	120	97	104,0	97,4
<i>Vin rouge N° 3</i>				
Vin naturel	27	—	8	—
Vin + 100 mg/l. vitamine C....	123	96	105	97
<i>Alicante-Bouschet</i>				
Vin naturel	51	—	7	—
Vin + 50 mg/l. vitamine C.....	102	51	60	52

On remarque que la vitamine C ajoutée se retrouve sans surcharge ou déficience aussi bien dans les vins déféqués que dans les vins non déféqués.

Étude du précipité mercurique dans les vins.

Les résultats sont représentés dans le tableau 4.

TABLEAU 4
Précipité mercurique et vitamine C

	Vin blanc (mg/l)	Vin rouge n° 1 (mg/l)	Vin rouge n° 2 (mg/l)	Alicante-Bouschet (mg/l)
Vin naturel	6,8	29	23	51
Vin déféqué	4,5	7	6,6	7
Précipité (Hg)	2,5	20	16,9	46
Vin déféqué + précipité	7,0	27	23,5	53

On constate que la « vitamine C apparente » qui disparaît du dosage effectué avec défécation se retrouve bien dans le précipité mercurique.

Aspect des précipités d'hydrazones formés dans les essais avec et sans défécation.

— Pour les jus de goutte peu colorés et les vins blancs et rosés, les précipités sont identiques.

— Pour les jus rouges de macération et les vins rouges, le précipité obtenu après défécation est beaucoup moins abondant que celui formé sans défécation, il est aussi plus léger et plus rouge.

— Dans la plupart des vins, après défécation, aucun précipité ou presque n'apparaît, il y a plutôt formation d'un louche.

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

L'aspect du précipité d'hydrazones dans les séries, déféquée et non déféquée, est en relation directe avec les variations subies par les doses d'acide ascorbique trouvées dans l'un et l'autre cas.

La défécation mercurique élimine des composés qui seraient dosés comme acide ascorbique et que l'on retrouve dans le composé mercurique. Ces composés font l'objet d'une étude systématique qui constituera la matière d'un deuxième mémoire.

Ceci démontre la nécessité de cette défécation qui, par ailleurs, n'entraîne pas la moindre perte d'acide ascorbique.

La technique de dosage de l'acide ascorbique de ROE et KUETHER (1943), appliquée aux jus de raisin colorés et aux vins, après défécation mercurique, semble pouvoir permettre une évaluation assez correcte de la dose de vitamine C qu'ils renferment.

Par cette méthode l'acide ascorbique a été trouvé dans les vins analysés à des doses faibles, de l'ordre de 3 à 9 mg par litre. Ces doses sont bien inférieures aux doses trouvées dans les jus de raisin frais qui varient de 20 à 60 mg par litre.

Reçu pour publication en juin 1965.

SUMMARY

THE ASCORBIC ACID CONTENT OF DEEP-COLOURED WINES AND JUICES

The ascorbic acid content of deep-coloured grape-juices and wines is given by the dinitrophenylhydrazine method of ROE and KUETHER, after effecting a mercuric clarification to eliminate the colouring and tannoid matter which interfere with determination. Ascorbic acid contents of 3-9 mg/l have been found in wine and 20-60 mg/l in fresh grapejuice.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- OURNAC Andrée, 1953. Recherches sur la variation de la teneur en acide ascorbique et en facteur P du jus de raisin en fonction de son mode de préparation. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 99.
ROE J. H., KUETHER C. A., 1943. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2-4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. *J. Biol. Chem.*, **147**, 399.

- ROE J. H., ESTERLING M. J., 1944, The determination of dehydroascorbic acid and ascorbic acid in plant tissues by the 2-4 dinitrophénylhydrazine method. *J. Biol. Chem.*, 152, 511.
- SÉMICHON L., FLANZY M., 1926. Recherches sur la défécation des liquides sucrés par les sels mercuriques. *Ann. Fals. Fraudes*, 19, 208-226.
- TAVERNIER J., JACQUIN P., 1946. La vitamine C dans la pomme et les produits dérivés de la pomme. *Bull. Ass. Chimistes*, 63, 111-128.

INFLUENCE DES PORTE-GREFFES SUR LA COMPOSITION MINÉRALE DES VINS DES VIGNES DE TERRAINS SALÉS

C. JOURET et P. BÉNARD

Station d'Agronomie et d'Œnologie, Toulouse (Haute-Garonne)
Station centrale de Technologie des Produits végétaux, Narbonne (Aude),

SOMMAIRE

L'étude de la composition minérale des vins de vignes de terrains salés a été effectuée durant deux années consécutives.

Le terrain d'expérimentation comprend 8 parcelles de *Carignan* sur des porte-greffes différents et 2 de *vinifera*, *Carignan* et *Clairette* francs de pied.

Les teneurs des vins en Cl, Na, Br ainsi que les rapports $\frac{Cl}{Na}$ et $\frac{K}{Na}$ qu'ils présentent sont discutés.

I. — INTRODUCTION

Le but de cette étude est d'apporter une contribution supplémentaire à la connaissance de la composition minérale des moûts et des vins provenant de vignes plantées dans des terres plus ou moins salées de bord de mer et d'essayer de dégager le rôle sélectif que pourraient jouer les porte-greffes sur l'absorption des composés minéraux.

Le terrain qui a servi à cette étude est complanté en *Carignan* greffé sur huit porte-greffes différents réputés comme résistants au chlorure de sodium dans la région : *Rupestris du Lot* ; *Richter 31* (*Berlandieri* Rességuier n° 2 $\times$ *Novo Mexicana*) ; *SO4* (*Riparia* $\times$ *Berlandieri*) ; *Castel 196-17* (*[Mourvèdre* $\times$ *Rupestris Martin]* $\times$ *Riparia* gloire) ; *Castel 216-3* (*[Solonis* $\times$ *Riparia]* $\times$ *Rupestris du Lot*) ; *Paulsen 1103* (*Berlandieri* Rességuier n° 2 $\times$ *Rupestris du Lot*) ; *Grezt 1* (*[Solonis* $\times$ *Riparia]* $\times$ *Rupestris du Lot*) ; *Couderc 1616* (*Solonis* $\times$ *Riparia*).

Les *vinifera* s'adaptant le mieux au sel, deux *vinifera* francs de pied, *Carignan* et *Clairette*, ont été plantés sur la parcelle expérimentale.

Initialement, chaque lot de porte-greffes devait comprendre 300 souches réparties sur 3 rangs. Par suite d'une très mauvaise reprise sur une partie du terrain anciennement cultivé en luzerne (due à un taux de chlorure de sodium de 2 p. 1 000 dans le sol), seulement 160 souches en moyenne constituent chacun des lots ; la reprise s'est effectuée uniquement sur la partie de la parcelle qui portait antérieurement de la vigne. Le taux de NaCl dans le sol variant, dans ce cas, au moment de la plantation de 0,2 à 0,5 p. 1 000.

Il n'y a pas, compte tenu de l'exiguïté relative du terrain, de répétition des différents lots de porte-greffes.

2. — PROTOCOLE DES ESSAIS

A maturité, 1 500 grains environ, ont été récoltés au hasard sur l'ensemble des souches de chacun des lots. Ces grains étaient ciselés avec une fraction de rafle. L'ensemble foulé, placé dans une bouteille de 4 litres a été mis à fermenter dans une salle à 25°C. Le vin obtenu constitue l'échantillon vin rouge.

Les grappes des différents lots sont ensuite récoltées entièrement et pressurées.

Un échantillon de ce moût homogénéisé, est mis à fermenter dans une bouteille de 4 litres et constitue l'échantillon vin rosé.

Les essais ont été menés durant les vendanges des années 1963 et 1964.

Les méthodes analytiques employées sur les éléments courants sont celles indiquées dans le recueil d'analyses des vins de JAULMES (1951). K, Na, Ca ont été dosés par des techniques de spectrophotométrie de flamme mis au point dans notre laboratoire (JOURET, 1965) ; Mg par complexométrie (CASTINO, 1960). Le Br a été analysé suivant la technique de JAULMES, BRUN et CABANIS (1962).

D'autre part, trois prélèvements d'échantillons de terre ont été faits entre les rangées de souches de chaque lot à 2 profondeurs (entre 0 et 20 cm et 20 et 40 cm). Le dosage du chlore et du sodium a été effectué sur ces échantillons au mois d'août 1964. Les doses de chlore sont de 1,25 à 3 méq et celles de sodium de 3,5 à 6 méq par kilogramme de terre sèche. La couche la plus profonde étant de 10 à 20 p. 100 plus riche que la couche superficielle.

3. — RÉSULTATS

Dans les tableaux suivants ont été rassemblés les résultats analytiques obtenus sur les vins rouges et rosés.

Pour ne pas surcharger les tableaux, les chiffres des dosages de PO_4 , SO_4 , Ca ; Mg, Fe, Cu, Mn, ne présentant pas d'intérêt particulier dans cette étude, ne sont pas indiqués.

Dans la situation particulière du vignoble, les substances minérales intéressantes à examiner sont surtout le chlore et le sodium.

Les teneurs de chlore retrouvées dans les vins des différents porte-greffes pour les deux années d'expérimentation sont du même ordre de grandeur ; en comparant les divers résultats, il semble que le porte-greffe G 1, et les deux *vinifera* francs de pied absorbent plus facilement cet anion. Les teneurs trouvées sont parfois le triple de celles des autres porte-greffes.

Pour le sodium, les différences observées sont moins nettes : il paraît cependant que le *Rupestris du Lot*, le R 31, les *Carignan* et *Clairette* d'une part, le 196-17 et

le G 1 à un degré moindre sont caractérisés par une teneur assez élevée en sodium, tandis que le SO 4, le 216-3 et le 1616 absorberaient peu de ce cation. Les vins rouges ayant macéré et fermenté en présence de la rafle, sont plus riches en substances minérales, en particulier en chlore, comparativement aux vins rosés.

TABLEAU I
Échantillons vins rosés 1963

	°alcoolique	Acidité totale	Cendres g/l	Cl méq/l	K méq/l	Na méq/l	K/Naméq	Cl/Na méq
<i>Rupestris du Lot</i>	10,40	4,7	2,42	0,7	20,5	5,5	3,7	0,12
<i>R 31</i>	10,60	4,3	2,35	1,0	21,0	3,2	6,5	0,31
<i>SO 4</i>	10,15	3,5	2,14	0,6	18,0	2,1	8,5	0,28
<i>196-17</i>	9,75	4,9	2,00	0,7	16,6	2,4	6,9	0,29
<i>216-3</i>	10,10	3,2	2,33	0,7	19,7	1,6	12,3	0,43
<i>P 1103</i>	9,60	3,4	2,26	0,5	19,2	2,2	8,7	0,22
<i>G 1</i>	10,00	3,5	2,30	3,2	17,6	2,2	8,0	1,45
<i>1616</i>	9,15	3,5	2,15	0,9	15,3	1,7	9,0	0,52
<i>Carignan</i>	10,30	5,6	2,10	2,3	15,0	3,3	4,5	0,69
<i>Clairette</i>	14,80	2,5	5,50	4,0	56,4	4,8	11,7	0,83

On peut ouvrir ici une parenthèse pour souligner que les différentes parties d'un végétal étant de richesse très variable en éléments minéraux (FLANZY, 1947), toutes les expérimentations faites sur vigne (action de fumures, carences en éléments

TABLEAU 2
Échantillons vins rouges 1963

	°alcoolique	Acidité totale	Cendres g/l	Cl méq/l	K méq/l	Na méq/l	K/Naméq	Cl/Na méq
<i>Rupestris du Lot</i>	11,00	3,3	2,64	2,0	18,2	5,2	3,5	0,38
<i>R 31</i>	10,10	3,5	2,70	2,6	19,2	4,3	4,4	0,60
<i>SO 4</i>	10,05	3,9	2,55	1,9	19,5	2,4	8,1	0,79
<i>196-17</i>	9,85	3,5	2,54	2,6	17,5	3,4	5,1	0,76
<i>216-3</i>	10,00	3,7	2,78	2,4	20,0	2,2	9,0	1,09
<i>P 1103</i>	9, 50	3,8	2,63	1,8	18,7	3,0	6,2	0,60
<i>G 1</i>	10,25	5,6	3,05	10,6	22,2	3,4	6,5	3,11
<i>1616</i>	9,15	3,8	2,30	2,6	16,6	2,3	7,2	1,13
<i>Carignan</i>	11,20	3,4	2,95	7,0	22,0	4,7	4,6	1,49
<i>Clairette</i>	14,50	2,5	4,65	5,6	38,6	5,7	6,7	0,98

minéraux, etc.) ne donnant pas d'analyse du fruit, et ce sont les plus nombreuses, ne sont pas exploitables par le technologue.

Les taux de brome trouvés confirment ceux de JAULMES et *al.* (1963) et l'on peut reproduire la conclusion de ce travail : « D'une manière générale, pour les vins

contenant 80 à 120 mg de chlore par litre, la teneur en brome se rapproche de 1 mg. Pour les vins contenant plus de 100 mg de chlore par litre, la teneur en brome est presque toujours supérieure à 1 mg par litre. »

TABLEAU 3
Échantillons vins rosés 1964

	° alcoolique	Acidité totale	Cendres g/l	Cl méq/l	K méq/l	Na méq/l	K/Naméq	Cl/Na méq
<i>Rupestris du Lot</i>	11,00	4,3	2,56	0,74	17,2	3,0	5,7	0,24
<i>R 31</i>	10,80	4,2	2,30	0,84	15,25	2,9	5,2	0,29
<i>SO 4</i>	10,30	5,2	2,06	0,64	13,90	2,1	6,55	0,30
<i>196-17</i>	11,20	5,4	2,00	0,76	13,6	2,7	5,1	0,28
<i>216-3</i>	11,20	3,8	2,07	0,86	14,3	2,0	7,1	0,43
<i>P 1103</i>	11,60	4,6	2,13	0,80	14,35	2,3	6,3	0,34
<i>G 1</i>	11,00	4,7	2,12	2,20	14,60	2,3	6,2	0,95
<i>1616</i>	11,50	4,2	2,23	0,96	14,50	2,2	7,1	0,43
<i>Carignan</i>	10,90	4,0	2,03	1,75	13,60	2,7	5,05	0,64
<i>Clairette</i>	10,80	3,4	2,51	1,54	16,65	2,95	5,6	0,52

TABLEAU 4
Échantillons vins rouges 1964

	° alcoo-lique	Acidité totale	Cendres g/l	Cl méq/l	Br mmg/l	K méq/l	Na méq/l	K/Naméq	Cl/Na méq
<i>Rupestris du Lot</i>	11,60	4,1	3,67	1,60	0,60	26,6	3,80	6,90	0,42
<i>R 31</i>	11,00	4,2	3,26	2,56	0,88	26,9	3,85	6,98	0,66
<i>SO 4</i>	10,15	4,3	2,96	1,76	0,70	24,7	2,65	9,25	0,66
<i>196-17</i>	11,40	4,5	2,83	2,35	0,88	25,0	3,90	6,40	0,60
<i>216-3</i>	11,00	4,1	3,07	2,05	0,94	28,7	2,35	12,25	0,87
<i>P 1103</i>	11,20	4,2	3,16	1,55	0,75	28,2	3,00	9,40	0,51
<i>G 1</i>	10,80	4,6	3,14	6,45	2,16	27,7	3,35	8,30	1,92
<i>1616</i>	11,50	4,2	3,05	2,55	1,20	28,2	2,80	10,15	0,91
<i>Carignan</i> ..	10,45	4,7	2,97	5,45	1,80	26,15	3,70	7,00	1,47
<i>Clairette</i> ...	10,65	2,9	3,15	5,15	1,00	27,70	4,95	5,60	1,04

4. — DISCUSSION ET RÉSULTATS

L'hypothèse a été avancée d'une absorption corrélative de sodium et de chlore par la vigne.

Dans les vins étudiés ici, le rapport Cl/Na en méq est le plus souvent inférieur à l'unité, quelque fois supérieur. Le rapport dans les vins rouges est comparativement plus élevé que dans les vins rosés du fait signalé plus haut, de la différence de composition minérale entre la rafle et la pulpe. GROHMANN (1939) dans ses essais ne trouve

qu'une lointaine relation entre ces deux éléments. Le rapport Cl/Na des vins analysés variant de 0,25 à 2,0 suivant les résultats rapportés par AMERINE

De même, en faisant le rapport Cl/Na de neuf vins rouges et rosés analysés par BRÉMOND (1937) dans son étude sur l'acidité des vins, nous trouvons un seul rapport supérieur à l'unité ; six échantillons présentent un rapport voisin de 0,40 et deux de 0,70.

JAULMES et *al.* (1963) trouvent également un rapport variable mais, cependant plus souvent supérieur à l'unité sur des vins d'origine diverse.

Dans une étude préliminaire (JOURET et POUX, 1961) un rapport Cl/Na très nettement supérieur à l'unité était signalé sur des vignes présentant des signes pathologiques de salure ; la teneur en Cl et Na des vins provenant de ces vignes, était beaucoup plus élevée que la normale. Il faut rapprocher à ce sujet, l'observation faite par EHLIG (1960) qui note que les signes de salure n'apparaissent sur la vigne que lorsque le taux de Cl de la plante est important.

Enfin, des analyses faites sur 82 vins rouges des Corbières de l'année 1963, ont donné pour 51 échantillons un rapport Cl/Na inférieur à l'unité, pour 19 échantillons un rapport égal à 1 et 12 vins présentaient un rapport supérieur à 1.

Donc, s'il existe généralement, une relation approximative entre Cl et Na présents dans les vins, le rapport d'absorption n'est pas constant et suivant les conditions culturales et climatiques, le chlore est plus ou moins absorbé comparativement au sodium.

Le rapport K/Na varie aussi dans des limites très larges, ce qui peut être grave pour la commercialisation. Ainsi, une circulaire du 13 mai 1964 du Service de la Répression des Fraudes, rappelle que les importateurs allemands admettent pour les vins un rapport en poids K/Na de 100/1 à 20/1 comme normal et un rapport limite de 10/1. Dans nos échantillons, 7 sur 20 vins rosés et 5 sur 20 vins rouges auraient été rejetés comme soupçonnés de manipulations illicites.

De même, dans les vins analysés par BRÉMOND (1937) cinq échantillons sur neuf ont un rapport K/Na en poids inférieur à 10/1, un seul échantillon ayant un rapport de 20/1, les trois autres étant compris entre 10/1 et 20/1.

Les observations faites durant deux années consécutives permettent d'atténuer le rôle du facteur climatique. Cependant, le stade de maturité différent des grappes récoltées et l'hétérogénéité du sol de la parcelle peuvent également influencer sur les résultats.

L'hypothèse d'une récolte des raisins des parcelles d'expérimentation à un état différent de maturité peut paraître confirmé par la variabilité des acidités totales et de degrés alcooliques des vins obtenus.

La différence est surtout sensible pour les vins de *Clairette* de l'année 1963 dont les grappes avaient atteint un degré net de surmaturation.

L'absorption des substances minérales par la plante variant pendant la maturation, les résultats comparatifs effectués peuvent donc être erronés. Les erreurs introduites sont apparemment faibles, toutefois, pour les éliminer, deux prises d'échantillonnage de 500 grains ont été faites au cours de la maturation de l'année 1964 : les quantités des substances minérales analysées dans les moûts diffèrent en valeur absolue de celles retrouvées dans les vins, mais les mêmes observations sur l'absorption du Cl et du Na pour la série de porte-greffes étudiés peuvent être énoncées.

D'autre part, la variabilité de la teneur en NaCl du sol peut influencer sur les ré-

sultats. Cependant, en comparant les résultats analytiques et les analyses des prélèvements de terre faits sur les parcelles, il ne semble pas y avoir une corrélation entre les doses de chlore et de sodium retrouvées dans les vins et celles du sol. Les porte-greffes reconnus comme donnant les vins les plus riches en Chlore se trouvant sur la portion de terrain la moins chargée en NaCl à l'inverse du porte-greffe 216-3 qui, lui, est situé sur la portion de terrain la plus riche en sel.

Cependant d'autres dosages de NaCl avaient été effectués avant la plantation ; les teneurs varient avec le temps et dépendent certainement du niveau de la nappe phréatique salée et du régime des pluies. Durant la maturation, les quantités relatives d'éléments minéraux absorbés par la plante varient ; il paraît donc très difficile de se rendre compte exactement de l'influence du sol, d'autant que des caractéristiques physico-chimiques de la terre entrent également en ligne de compte. Cet aspect du problème demande des études complémentaires ; notre but initial a été de connaître les caractéristiques des produits obtenus dans ces situations culturales particulières et les possibilités d'intervention par le choix du porte-greffe.

5. — CONCLUSION

Dans nos conditions expérimentales la nature du porte-greffe semble jouer sur l'absorption du NaCl ; le *G 1* et les *vinifera* francs de pied *Carignan* et *Clairette* donnent des vins plus riches en Chlore. Pour le Sodium, les différences sont moins nettes : le *Rupestris du Lot*, le *R 31*, le *Carignan*, la *Clairette* et à un degré moindre le *196-17* et le *G 1* paraissant plus avides de ce cation.

Il est nécessaire d'étudier ces porte-greffes dans d'autres situations pour confirmer ces premiers résultats. Cependant d'un point de vue technologique on peut admettre que le rapport Cl/Na varie suivant les conditions culturales et climatiques. L'absorption de Cl comparativement à Na variant dans des limites importantes.

De même, le rapport K/Na varie et il peut être inférieur à 10/1 en poids pour des vins naturels.

Reçu pour publication en mai 1965

SUMMARY

THE INFLUENCE OF STOCKS ON THE MINERAL COMPOSITION OF WINES FROM VINES GROWN IN SALINE SOILS

Over two consecutive years, mineral analysis were made of wines obtained from vines grown near the sea in soil with a greater or lesser degree of salinity.

The experimental plot consisted of 8 blocks, 6 of which were of *Carignan* grafted on different stocks, and 2 were ungrafted vines, *Carignan* and *Clairette*.

Under the experimental conditions, NaCl uptake varied with the stock ; the *G¹* stock and the two ungrafted vines gave wines much richer in chlorine. Less marked differences were observed in sodium uptake.

It can be stated that the Cl/Na ratio varies within wide limits, according to cultural and climatic conditions.

Likewise, the K/Na ratio can be less than 1/10 by weight in natural wines.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- BRÉMOND E., 1937. *Contribution à l'étude analytique et physico-chimique de l'acidité des vins*. Thèse doctorat.
- CASTINO M., 1960. Détermination complexométrique du Ca et du Mg dans les vins. *Riv. vitic. Enol. Conogliano*, **13**, 305-311.
- EHLIG C. F., 1960. Effects of salinity on four varieties of table grapes grown in sand culture. *Ann. Soc. hortic. Sci.*, **76**, 323-331.
- FLANZY M., 1947. Le potassium dans le cep de vigne. *Ann. agron.*, **17**, 545-563.
- GROHMANN H., 1939. Direkte bestimmung von chlor im Wein und sein gehalt bei pfälzer und ausländischen weinen. *Z. Untersuch. Lebensm.* **77**, 482-488. Cité dans Amerine M. A. *Composition of wines. II. Inorganic constituent Adv. in Food Research* 1958, **8**, 197.
- JAULMES P., BRUN M^{me} S., CABANIS J.-C., 1962. La teneur en chlore et en brome des vins et la recherche des antiseptiques bromés. *Chim. Anal.*, **44**, 327-330.
- JAULMES P., 1951. *Analyses des vins*, Poulain.
- JOURET C., POUX C., 1961. Note sur les teneurs en potassium, sodium et chlore des vignes des terrains salés. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 369-374.
- JOURET C., 1965. Dosage du Na, K, Ca dans les vins par spectrophotométrie de flamme. (A paraître).

NOTE

NOTE SUR LA COMPOSITION EN ACIDES ORGANIQUES NON VOLATILS DES PIMENTS DOUX

M. SOUTY, P. ANDRÉ et Liliane BREUILS

*Station de Technologie des Produits végétaux,
Centre de Recherches agronomiques du Sud-Est, Montfavet (Vaucluse)*

SOMMAIRE

Après avoir mis en évidence, dans un précédent travail, l'intérêt de l'étude des piments doux, les auteurs, qui avaient constaté une augmentation très importante de l'acidité totale lors de la maturation de ce fruit, font ici un bilan des acides organiques des deux variétés les plus utilisées actuellement dans le programme de sélection de la Station d'Amélioration des Plantes maraîchères du Centre de Recherches agronomiques du Sud-Est.

Cette augmentation d'acidité est due à l'accumulation de l'acide citrique alors que l'acide malique est brûlé normalement.

INTRODUCTION

Dans un précédent travail ayant pour objet de déterminer la teneur en vitamine C de diverses variétés de piments doux, nous avons constaté que l'acidité totale de ces légumes augmentait au cours de la maturation (M. SOUTY, P. ANDRÉ, 1965).

Ce phénomène était d'autant plus intéressant à préciser que les piments sont utilisés de deux manières différentes, chaque utilisation correspondant à un stade de cueillette différent :

comme légumes de table : { verts, à consommer crus,
 { mûrs, à consommer après cuisson ;
comme légumes industriels, à maturité.

Pour l'usage industriel, la coloration (rouge) constitue le facteur principal de la qualité, les piments étant utilisés sous forme de poudre, ou comme matière pre-

mière dont on extrait les caroténoïdes, pour colorer divers produits déshydratés. Pour l'usage « table », c'est la valeur du rapport $\frac{\text{sucres}}{\text{acides}}$ qui détermine un des critères principaux de la saveur de ce légume, donc sa qualité.

MATÉRIEL ET MOYENS D'ÉTUDE

Nous avons étudié les deux variétés de piment doux qui sont actuellement les plus utilisées dans le programme de sélection de la Station d'Amélioration des Plantes maraîchères du C. R. A. du Sud-Est.

La variété *Yolo-Wonder*, très cultivée aux États-Unis, possède de gros fruits à section carrée, de forme régulière. Elle peut servir aussi bien à la consommation à l'état mûr qu'à la transformation industrielle.

La variété *Antibo* est issue d'une population locale. Elle possède un fruit sphérique, comme le type *Niora*, mais beaucoup plus grand. Sa richesse en pigments caroténoïdes la désigne pour une utilisation industrielle telle que la fabrication de la poudre. Rappelons que la variété *Niora* est la variété utilisée industriellement en Espagne pour l'extraction de sa matière colorante.

Les fruits ont été récoltés au cours de l'été 1964. Nous avons prélevé le même jour des fruits verts ayant atteint leur développement normal et tels qu'ils sont cueillis généralement pour la commercialisation, et des fruits ayant atteint leur plein état de maturité.

Les fruits ont aussitôt été fixés dans l'alcool à 95° bouillant ; puis, les jus d'extraction alcoolique et aqueuse, après purification sur Permutite 50 et Amberlite IRA 400, ont été analysés par chromatographie sur gel de silice et sur résine Dowex 1 selon la technique décrite par L. ROUX et C. LESAINT (1959).

La chromatographie sur gel de silice permet la séparation et le dosage de la plupart des acides organiques. La chromatographie sur résine permet, d'une part, de contrôler et confirmer les résultats obtenus sur la silice et, d'autre part, de doser la somme des acides quinique, shikimique et glycérique, lorsqu'ils existent.

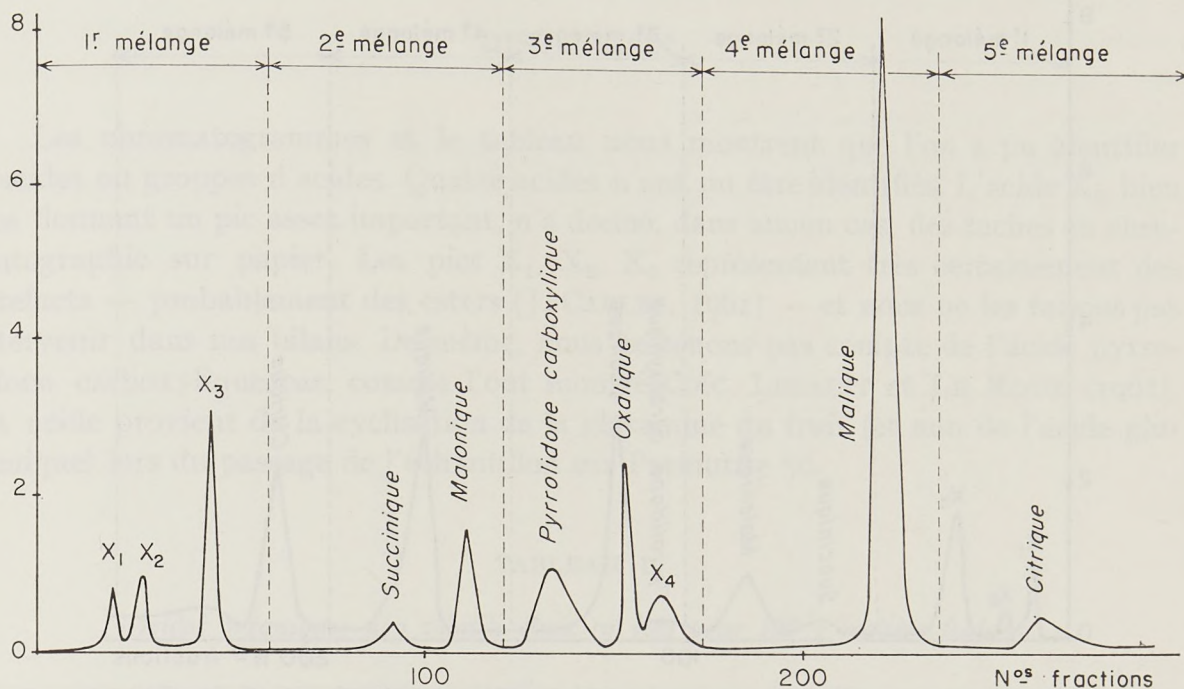
L'identification des acides a été effectuée par chromatographie descendante sur papier Whatman 1 en présence d'acides témoins au moyen du solvant *n*-butanol-acide formique-eau (10-2-15), et en utilisant comme révélateur, suivant les cas, le vert de bromocrésol, le bleu de bromophénol ou le nitrate d'argent ammoniacal.

RÉSULTATS

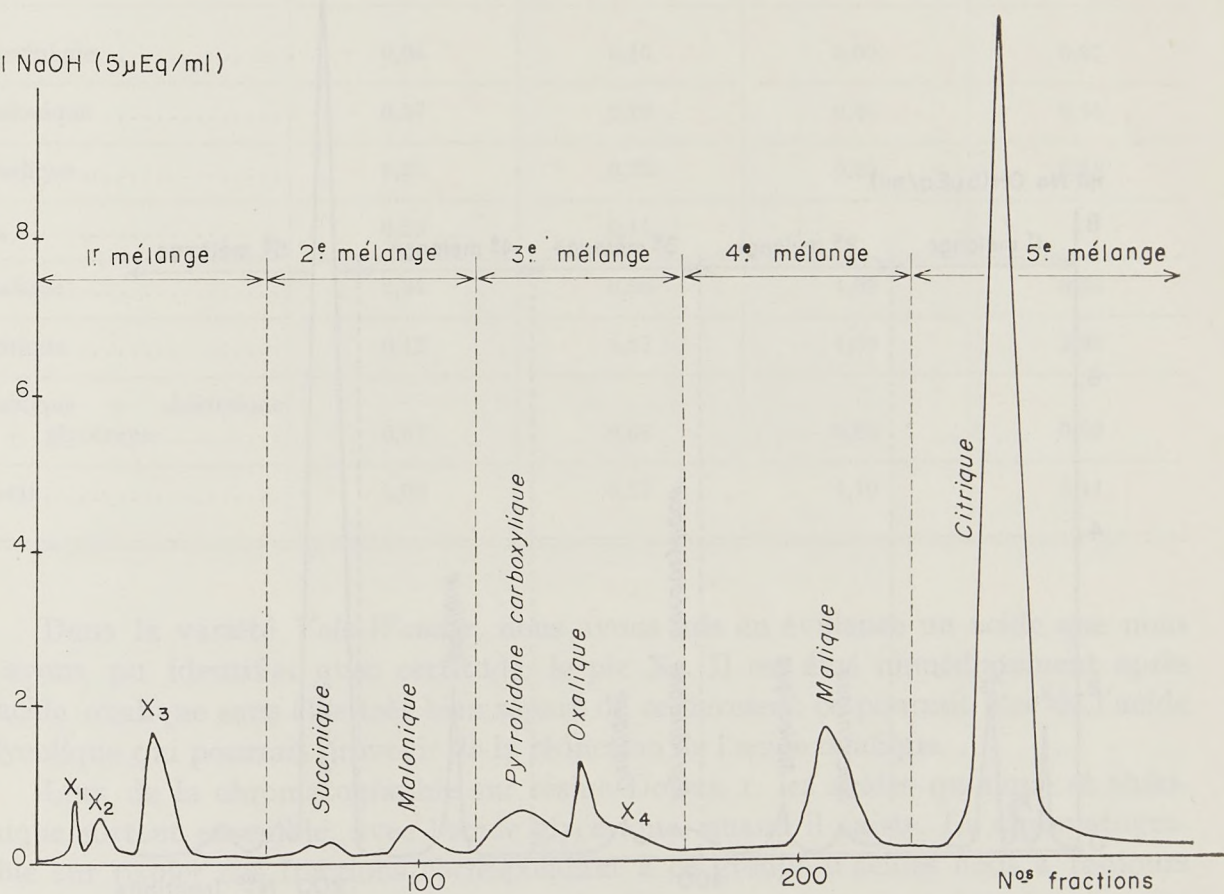
Nous avons tracé les chromatogrammes des séparations sur gel de silice et sur résine Dowex 1, respectivement pour le piment vert et le piment rouge des deux variétés étudiées. Les graphiques 1 à 4 représentent les chromatogrammes des séparations sur gel de silice.

Nous avons, dans le tableau, dressé la liste des acides organiques élués lors des deux chromatographies et nous avons calculé leurs taux respectifs en les exprimant en milliéquivalents pour 100 g de matière fraîche. Les graphiques 5 et 6 représentent le pourcentage de chacun de ces acides afin de déterminer leur importance relative dans chaque cas.

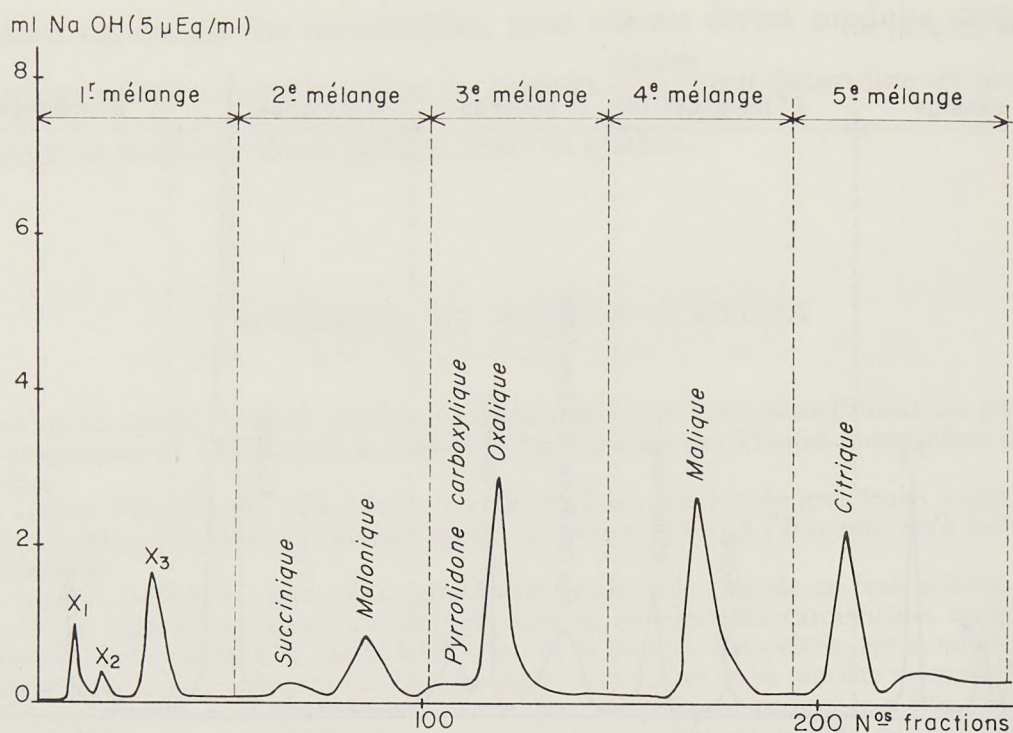
Dans le tableau et les graphiques 5 et 6, nous n'avons pas fait figurer ni tenu compte des acides X_1 , X_2 , X_3 et de l'acide pyrrolidone carboxylique qui sont des artefacts ainsi que nous allons le voir.

ml Na OH (5 μ Eq/ml)

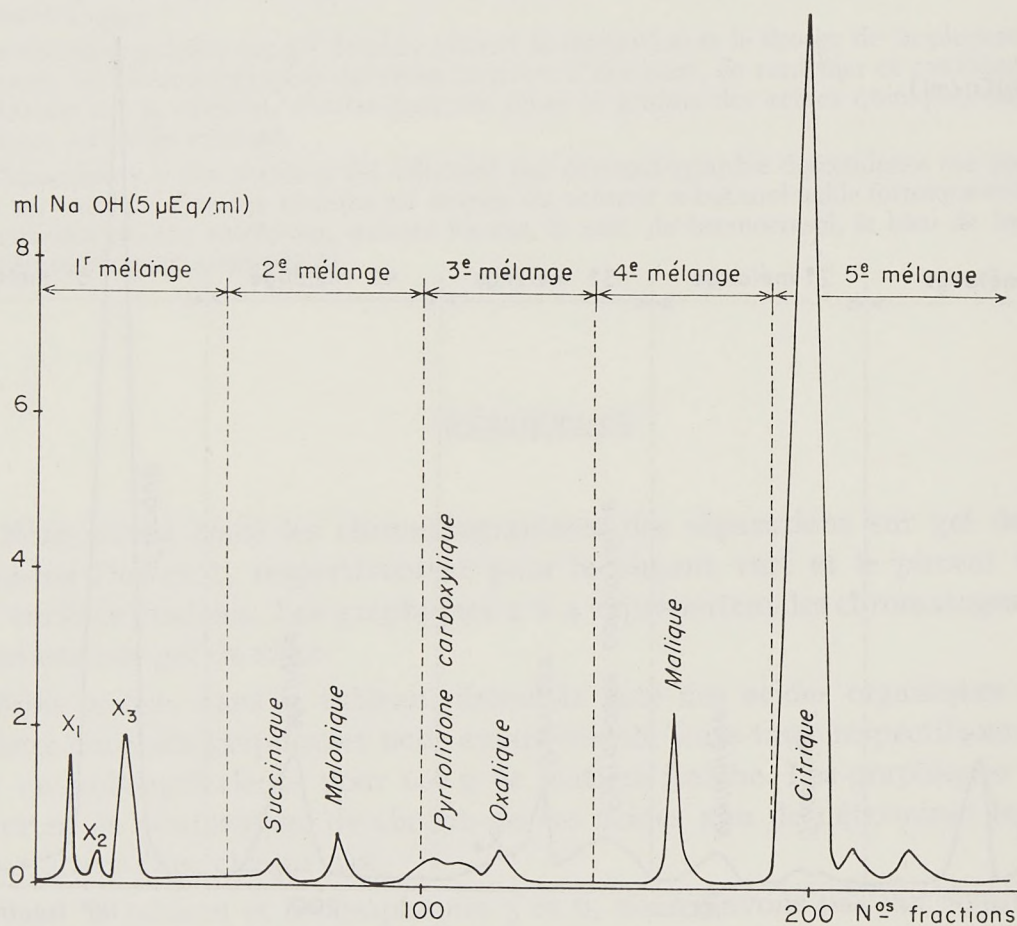
GRAPHIQUE 1. — Chromatogramme des acides organiques (séparés sur gel de silice) des piments de la variété Yolo-Wonder, non mûrs

ml NaOH (5 μ Eq/ml)

GRAPHIQUE 2. — Chromatogramme des acides organiques (séparés sur gel de silice) des piments de la variété Yolo-Wonder, mûrs



GRAPHIQUE 3. — Chromatogramme des acides organiques (séparés sur gel de silice) des piments de la variété Antibois, non mûrs



GRAPHIQUE 4. — Chromatogramme des acides organiques (séparés sur gel de silice) des piments de la variété Antibois, mûrs

DISCUSSION

Les chromatogrammes et le tableau nous montrent que l'on a pu identifier 8 acides ou groupes d'acides. Quatre acides n'ont pu être identifiés. L'acide X₃, bien que donnant un pic assez important, n'a donné, dans aucun cas, des taches en chromatographie sur papier. Les pics X₁, X₂, X₃ représentent très certainement des artefacts — probablement des esters (J. CARLES, 1961) — et nous ne les faisons pas intervenir dans nos bilans. De même, nous ne tenons pas compte de l'acide pyrrolidone carboxylique car, comme l'ont montré COÏC, LESAINT et LE ROUX (1961), cet acide provient de la cyclisation de la glutamine du fruit (et non de l'acide glutamique) lors du passage de l'échantillon sur Permutite 50.

TABEAU I

Acides organiques non volatils élués en méq pour 100 g matière fraîche

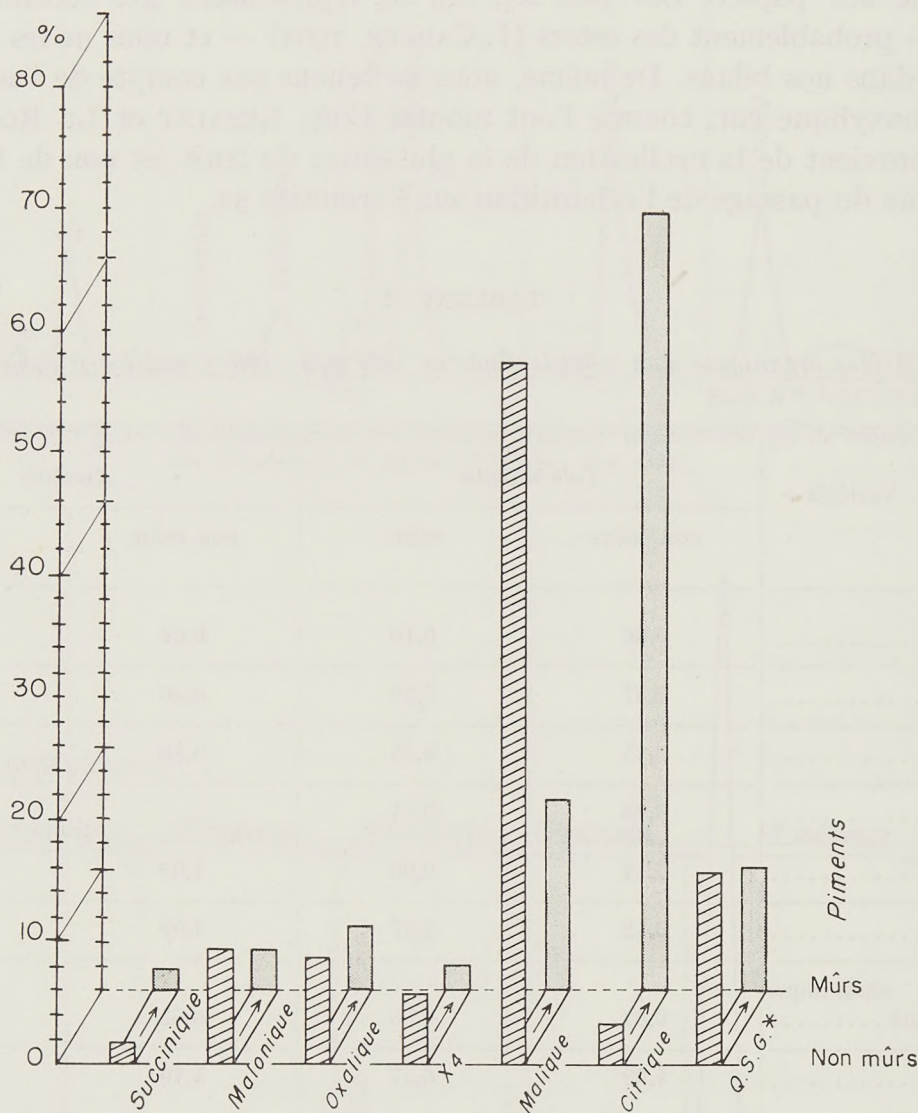
Variétés→ Acides ↓	Yolo-Wonder		Antibois	
	non mûrs	mûrs	non mûrs	mûrs
Succinique	0,06	0,10	0,09	0,07
Malonique	0,37	0,19	0,36	0,14
Oxalique	0,35	0,35	0,85	0,13
X ₄	0,23	0,14		
Malique	2,34	0,96	1,09	0,52
Citrique	0,12	4,17	1,09	3,92
Quinique + shikimique + glycérique	0,62	0,66	0,62	0,63
Total	4,09	6,57	4,10	5,41

Dans la variété *Yolo-Wonder*, nous avons mis en évidence un acide que nous n'avons pu identifier avec certitude, le pic X₄. Il est élué immédiatement après l'acide oxalique sans être très bien séparé de ce dernier : ce pourrait être de l'acide glycolique qui pourrait provenir de la réduction de l'acide oxalique.

Lors de la chromatographie sur résine Dowex 1, les acides quinique et shikimique sortent ensemble, avec l'acide glycérique, quand il existe. La chromatographie sur papier des fractions correspondant à ce groupe d'acides nous a toujours permis de déceler les acides quinique et glycérique et, uniquement dans les piments mûrs, l'acide shikimique en faible quantité.

Cette observation est en bon accord avec divers travaux, ceux de A. C. HULME (1958) notamment. Cet auteur pense que l'acide shikimique serait un métabolite intermédiaire dans la biosynthèse des substances aromatiques et n'apparaîtrait que lorsqu'il serait « libéré » par le ralentissement des processus métaboliques dans les tissus arrivés à pleine maturité.

L'acide oxalique, lorsqu'il existe dans les plantes ou dans les fruits, est généralement en quantité plus importante dans les fruits verts que dans les fruits mûrs.



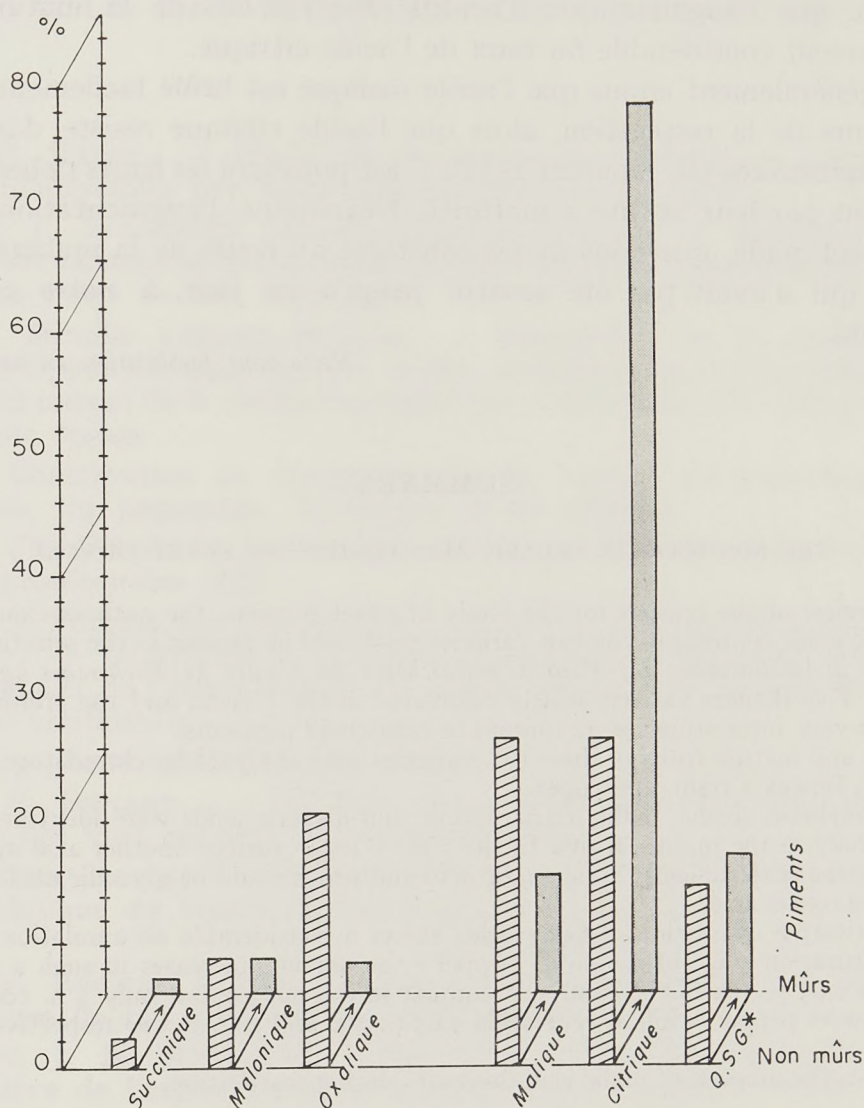
GRAPHIQUE 5. — Répartition des acides organiques dosés des piments de la variété Yolo-Wonder (Q. S. G = Quinique + Shikimique + Glycérique)

C'est bien ce que nous observons dans le cas du piment, mais le piment *Antibois* vert est plus riche que le piment *Yolo-Wonder* vert : 0,85 milliéquivalents pour 100 g de matière fraîche pour la variété *Antibois* contre 0,35 pour la variété *Yolo-Wonder*.

Les acides malique et citrique méritent un peu plus d'attention.

Le piment *Yolo-Wonder* vert renferme beaucoup d'acide malique (2,34 milliéquivalents pour 100 g frais, soit : 57,2 p. 100 de l'acidité totale) et très peu d'acide citrique (0,96 milliéquivalents, soit : 3 p. 100 de l'acidité totale) alors que le piment

Antibois vert a la même quantité de ces deux acides (1,09 milliéquivalents, soit : 26,6 p. 100 de l'acidité totale). Lorsque le piment mûrit, on observe, par contre, le même phénomène dans les deux variétés : diminution très nette du taux d'acide malique qui passe de 2,34 à 0,96 milliéquivalents (soit respectivement 57,2 et 14,6 p. 100 de l'acidité totale) pour la variété *Yolo-Wonder* et de 1,09 à 0,52 méq. (soit 26,6 à 9,6 p. 100 de l'acidité totale) pour la variété *Antibois*. Par contre, le taux



GRAPHIQUE 6. — Répartition des acides organiques dosés des piments de la variété *Antibois* (Q. S. G = Quinique + Shikimique + Glycérique)

d'acide citrique augmente très fortement et passe de 0,12 à 4,17 milliéquivalents (soit de 3 à 63,5 p. 100 de l'acidité totale) pour la variété *Yolo-Wonder* et de 1,09 à 3,92 milliéquivalents (soit de 26,6 à 72,5 p. 100 de l'acidité totale) pour la variété *Antibois*.

Il semble, d'après nos analyses, que le piment *Antibois* renfermerait, à l'état vert, autant d'acide malique que d'acide citrique (1,09 milliéquivalents pour 100 g de matière fraîche) alors que le piment *Yolo-Wonder* vert renfermerait beaucoup plus d'acide malique que d'acide citrique (2,34 et 0,12 milliéquivalents respectivement).

Ce fait pourrait provenir d'un état de maturité légèrement plus avancé pour cette variété lors de la cueillette, mais nous croyons plutôt qu'il résulte d'une différence variétale.

CONCLUSION

La comparaison des bilans des acides non volatils du piment vert et du piment mûr indique que l'augmentation d'acidité observée lors de la maturité est due à l'accroissement considérable du taux de l'acide citrique.

Il est généralement admis que l'acide malique est brûlé facilement par les cellules, au cours de la respiration, alors que l'acide citrique résiste davantage aux ferments respiratoires (R. ULRICH, 1952). C'est pourquoi les fruits riches en cet acide se distinguent par leur acidité à maturité. Néanmoins, l'augmentation importante du taux de cet acide, que nous avons constatée au cours de la maturation, est un phénomène qui n'avait pas été montré jusqu'à ce jour, à notre connaissance, dans les fruits.

Reçu pour publication en juillet 1965.

SUMMARY

THE NON-VOLATILE ORGANIC ACID CONTENT OF SWEET PEPPERS

After a review of the reasons for the study of sweet peppers, the authors examine the non-volatile organic acids contents of the two varieties most used at present in the selection programme of the *Station d'Amélioration des Plantes maraîchères du Centre de Recherches agronomiques du Sud-Est*: the *Yolo-Wonder* variety, widely cultivated in the U.S.A., and the *Antibois* variety, of local origin but very interesting for its content in carotenoid pigments.

The green and mature fruits of these two varieties were analysed by chromatographic methods using silica gel, Dowex 1 resin, and paper.

Succinic, malonic, oxalic, malic, citric, quinic and glyceric acids were identified in all cases, shikimic acid only in the mature fruits. In the *Yolo-Wonder* variety another acid appeared which was only separated with difficulty from oxalic acid and which could be glycollic acid resulting from the reduction of oxalic acid.

The quantitative estimation of these acids shows a considerable accumulation of citric acid during the maturation stage of the sweet pepper: the amount increases in such a way that this acid represents 63.5 p. 100 of the total acid content in the mature but only 3 p. 100 in the green *Yolo-Wonder* sweet pepper, while it represents 72.5 p. 100 and 26.6 p. 100 respectively in the *Antibois* variety.

In contrast, the amount of malic acid decreases during maturation.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- CARLES J., 1961. Des possibilités que donne la chromatographie pour remédier aux inconvénients que représente pour les acides organiques l'utilisation d'alcool comme fixateur et comme solvant. In *Séparation immédiate et chromatographie*, 178. G. A. M. S. Édit. Paris.
- COÏC Y., LESAINTE M^{me} C., LE ROUX M^{me} F., 1961. Comparaison des feuilles, entre-nœuds et nœuds du Blé au point de vue acides organiques et cations minéraux peu avant la floraison. *C.R. Acad. Sci.*, **252**, 4031-4033.
- HULME A. C., 1958. Quinic and shikimic acids in fruits. *Qual. Plant. Mat. Veg.*, 468-473.
- ROUX L., LESAINTE M^{me} C., 1959. Mise au point d'une technique de détermination des acides organiques chez les végétaux. *Ann. Physiol. vég.*, **1**, 83-91.
- SOUTY M., ANDRÉ P., 1965. Sur la composition chimique de quelques variétés de piments doux. *Ann. Technol. agric.*, **14**, 3, 291-297.
- ULRICH R., 1952 *La Vie des fruits*. 250. Masson Édit. Paris.

TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE 1965

C. BIZEAU, P. GALZY. — Étude de la respiration de quelques substrats non fermentescibles par <i>Saccharomyces cerevisiae</i> HANSEN	275
L. DEIBNER, J. MOURGUES, Mireille CABIBEL-HUGUES. — Évolution de l'indice des substances aromatiques volatiles des raisins de deux cépages rouges au cours de leur maturation	5
L. DEIBNER, Mireille CABIBEL-HUGUES. — Recherches sur la séparation des dinitrophénylhydrazones des acides cétoniques des jus de raisin et de vins au moyen de la chromatographie sur couche mince de cellulose en vue de leur dosage	331
E. DITZ. — Contribution au dosage des jus de fruits. Détermination du phosphore, du potassium, du sodium et du calcium.....	67
C. FLANZY, Ch. POUX. — Les levures alcooliques dans les vins. Protéolyse et protéogenèse (III)	35
M. FLANZY, J. PUISAIS, Ch. COMBESCOT, J. DEMARET, F. RENOAUD-BRAULT C. IGERT. — Contribution à l'étude physiologique des actions comparées du vin et de l'éthanol. Rôle du régime alimentaire. Importance du mode de vinification.....	263
P. JACQUIN. — La vitamine C dans la Cerise	157
C. JOURET, P. BÉNARD. — Influence des porte-greffes sur la composition minérale des vins des vignes de terrains salés	349
Simonne KUZDZAL-SAVOIE. — Influence de la ration alimentaire sur la composition chimique du beurre de vache (première partie)	99
(deuxième partie)	189
M. LHUISSIER, Évelyne BIETTE. — Libération enzymatique de la lysine des poudres de lait obtenues par pulvérisation	15
J. MAUGENET, J. N. MORFAUX. — Séparation, identification, évaluation quantitative de l'ergostérol et de ses précurseurs dans la levure	23
B. MONTIES, A. BARRET. — Étude chimique d'un trouble au froid réversible présent dans un jus de Pomme.....	167
Andrée OURNAC. — Étude du dosage de l'acide ascorbique dans les vins et dans les jus fortement colorés	341
M. B. PATAKY. — Sur les particularités du dosage spectrophotométrique des anthocyanes	79
E. PEYNAUD, S. LAFON-LAFOURCADE. — Étude d'un dosage simple de l'acide malique appliqué aux vins à l'aide de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> ..	49
E. PEYNAUD, J. BLOUIN. — Comparaison de quelques méthodes de dosage de l'acide L-malique	61
P. RIBÉREAU-GAYON, N. NEDELTCHEV. — Discussion et application des méthodes modernes de dosage des anthocyanes et des tanins dans les vins.....	321

M. SOUTY, P. ANDRÉ. — Sur la composition chimique de quelques variétés de piments doux	291
D. TERCELJ. — Étude des composés azotés du vin.....	307

Notes

P. DUBOIS. — Analyse des acides gras volatils par chromatographie en phase gazeuse de leurs esters octyliques	179
C. FLANZY, Ch. POUX. — Note sur la teneur en acides aminés du moût de raisin et du vin en fonction des conditions de l'année (Maturation et fermentation)	87
C. FLANZY, P. ANDRÉ. — Note sur le métabolisme des raisins en situation d'anaérobiose	173
M. SOUTY, P. ANDRÉ, Liliane BREUILS. — Note sur la composition en acides organiques non volatils de piments doux	357
<i>Chronique des livres</i>	93
—	299

CONTENTS

C. BIZEAU, P. GALZY. — Study of the respiration of some substrates non fermentescible by <i>Saccharomyces cerevisiae</i> HANSEN	275
L. DEIBNER, J. MOURGUES, Mireille CABIBEL-HUGUES. — Evolution of the index of volatile aromatic substances in the grapes of two red vine varieties during their maturation	5
L. DEIBNER, Mireille CABIBEL-HUGUES. — Investigations on the separation of the dinitrophenylhydrazones from the cetonic acides in grape juices and wines, by cellulose thin layer chromatography, with the purpose of their dosage by electrophotometry.....	331
E. DITZ. — Contribution to the dosage of fruit juices. Determination of phosphorus, potassium, sodium and calcium	67
C. FLANZY, Ch. POUX. — Alcoholic yeasts in wines. Proteolysis and proteogenesis (III)	35
M. FLANZY, J. PUISAIS, Ch. COMBESCOT, J. DEMARET, F. RENOUAUD-BRAULT C. IGERT. — Contribution to the physiological study of the relative effects of wines and ethanol. The role of alimentary regimen. The importance of the method of vinification	263
P. JACQUIN. — Vitamin C in Cherries	157
C. JOURET, P. BÉNARD. — The influence of stocks on the mineral composition of wines from vines grown in the saline soil	349
Simonne KUZDZAL-SAVOIE. — Effect on the chemical composition of dairy butter of the composition of the feed (first part)	99
(second part)	189
M. LHUISSIER, Évelyne BIETTE. — Enzymatic liberation of the lysine in powdered milk obtained by pulverisation	5
J. MAUGENET, J. N. MORFAUX. — Separation, identification and quantitative determination of ergosterol and its precursors in yeast.....	23
B. MONTIES, A. BARRET. — Chemical studies on reversible chill-haze in Apple juice	167
Andrée OURNAC. — The ascorbic acid of deep-coloured wines and juices	341

M. B. PATAKY. — On the particularity of spectrophotometric dosage of anthocyanins	79
E. PEYNAUD, S. LAFON-LAFOURCADE. — Study of a simple method of quantitative determination of malic acid applied to wines, using <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	49
E. PEYNAUD, J. BLOUIN. — Comparison of some methods of quantitative determination of L-malic acid	61
P. RIBÉREAU-GAYON, N. NEDELTCHEV. — Discussion and application of modern methods of determining the anthocyanins and the tanins content of wine	321
M. SOUTY, P. ANDRÉ. — On the chemical composition of some sweet peppers varieties	291
D. TERCELJ. — The study of nitrogenous compounds in wine	307

Notes

P. DUBOIS. — Analysis of volatil fatty gas liquid chromatography of their octylesters	179
C. FLANZY, Ch. POUX. — Note on the amino-acid content in grape must and wine according to the year's conditions (Maturation and fermentation)	8
C. FLANZY, P. ANDRÉ. — Note on the metabolism of grapes in conditions of anaerobiosis	173
M. SOUTY, P. ANDRÉ, LILIANE BREUILS. — The volatile organic acid content of sweet peppers	357

Book reviews	93
—	299